

**AUDREY CILLI CHIRELLI**

**PADRONIZAÇÃO E IMPLANTAÇÃO DE TÉCNICAS DE  
POTÊNCIA E IDENTIDADE GENÉTICA PARA  
CARACTERIZAÇÃO DAS CEPAS VACINAIS E DA VACINA  
DE ROTAVÍRUS REASSORTANT HUMANO-BOVINO (BRV-  
UK) PRODUZIDA PELO INSTITUTO BUTANTAN**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

**Área de Concentração:** Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria do Carmo Sampaio Tavares Timenetsky

**São Paulo**

**2010**

### FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de Controle de Doenças/SES-SP

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Chirelli, Audrey Cilli

Padronização e implantação de técnicas de potência e identidade genética para caracterização das cepas vacinais e da vacina de rotavirus reassortant humano-bovino (BRV-UK) produzida pelo Instituto Butantan / Audrey Cilli Chirelli - São Paulo, 2010.

Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo.

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública  
Orientadora: Maria do Carmo Sampaio Tavares Timenetsky

1. Rotavírus
2. Vacinas contra rotavírus
3. Testes de neutralização
4. Genoma viral
5. Experimentação animal

SES/CCD/CD-235/10

**Aos meus queridos pais, Antonio e Nadia  
por minha vida, pela dedicação e amor incondicional.  
Pelo incentivo em todos os momentos.**

**Às minhas irmãs, Simone e Alessandra,  
e sobrinhas, Giulia e Beatrix,  
que sempre deixam minha vida muito mais feliz.**

**Ao meu marido Izaniel,  
amor de minha vida,  
por toda paciência e incentivo dedicados.**

## **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

**A Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria do Carmo S.T. Timenetsky, meu agradecimento pela orientação e ensinamentos dedicados para a realização desta dissertação. Agradeço o apoio e o incentivo em todos os momentos de minha carreira profissional e pela imensa confiança que depositou em mim, sendo não somente orientadora, mas também uma grande amiga. Muito obrigada!**

## **AGRADECIMENTOS**

À Simone G. Morillo, minha grande amiga, pelos ensinamentos e ajuda dedicada. Por estar ao meu lado, nos bons e maus momentos, compartilhando experiências, idéias e risos. Meu apreço e admiração.

À Ana Paula de Torres Santos, amiga que tanto contribuiu e colaborou na realização deste trabalho, pelas conversas e amizade.

À amiga Claudia M. Koike, minha sincera gratidão pelo apoio e contribuição nesta jornada, e que sempre me apoiou nos momentos necessários.

À Adriana Luchs e Samira Julien Calux, pela contribuição e apoio dedicados à realização deste trabalho.

À amiga Sirlene Henrique Rodrigues que tanto me incentivou, pela amizade e carinho dedicados.

Aos amigos do Núcleo de Doenças Entéricas: Antonio, Bethânia, Bráulio, Carolina, Cibele, Cleusa, Creusa, Denise, Rita de Cássia que me ofereceram apoio e motivação em todos os momentos compartilhados.

À Fernanda Faria Costa, minha amiga querida que mesmo um pouco distante me ajudou e apoiou sempre, pela amizade verdadeira.

Aos colegas do Centro de Virologia do Instituto Adolfo Lutz, que direta ou indiretamente colaboraram na realização desta dissertação.

A Dra. Neuza Maria Frazatti Gallina, pelo apoio e incentivo na realização deste trabalho.

Aos funcionários do laboratório Experimental de Rotavírus do Instituto Butantan, pelo fornecimento de insumos e amostras utilizadas neste estudo.

À Sandra Alves de Moraes, bibliotecária da Secretaria da Saúde/Instituto Adolfo Lutz, pela confecção da ficha catalográfica, atendendo com muita presteza e simpatia.

Aos membros examinadores da banca de Qualificação, Prof. Dr. Luís Fernando de Macedo Brígido, Prof. Dr. Leonardo José Richzenhein e Prof. Dr. Celso Francisco Granato pelas valiosas sugestões.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças, pelos ensinamentos transmitidos.

A todos os funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças, pela colaboração e pelo apoio financeiro.

A Fundação Butantan, pelo apoio financeiro.

Enfim, meu agradecimento a todos que de maneira direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

## RESUMO

Os rotavírus são considerados os agentes virais mais importantes associados às diarreias agudas graves, de distribuição mundial, acometendo principalmente crianças menores de 5 anos. Os esforços para desenvolvimento de vacinas contra rotavírus tiveram início na década de 80 e continuam até hoje. O Instituto Butantan está produzindo uma vacina pentavalente contra rotavírus baseada na vacina *reassortant* humano-bovino tetravalente (BRV-UK) desenvolvida pelo NIH (National Institute of Health, EUA), composta pelos genótipos G1-G4 acrescida do genótipo G9 emergente no Brasil. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) para que a vacina de rotavírus vivo atenuado seja licenciada, alguns testes de produção, controle de qualidade e avaliação da segurança e eficácia da vacina são necessários. Esses testes devem ser realizados em diferentes etapas da produção da vacina. Este estudo teve como objetivo a padronização e implantação das técnicas necessárias para titulação e caracterização molecular das cepas vacinais e da vacina contra rotavírus produzida pelo Instituto Butantan. Após implantação, testes para a análise de amostras dos animais de experimentação foram realizados. Os testes de potência e neutralização foram realizados utilizando amostras padrões dos genótipos utilizados na vacina e, a partir daí, as amostras vacinais foram analisadas quanto à titulação obtendo-se títulos que variaram de  $10^5$  a  $10^7$ . Os testes de similaridade genética das amostras vacinais demonstraram 99,3% a 100% de similaridade em relação aos padrões. As amostras de animais de experimentação apresentaram soroconversão para os genótipos G1, G2, G3 e G4. Nos testes de excreção viral, sete amostras foram positivas para rotavírus e identificadas como genótipo G3P[?]. A padronização dos testes de titulação viral e neutralização possibilitaram a utilização destes testes para avaliação das amostras vacinais e para os testes utilizando animais de experimentação.

## ABSTRACT

Rotaviruses are considered the most important viral agents associated with severe acute diarrhea, worldwide distribution, affecting mainly children under 5 years. Efforts to developing rotavirus vaccines began in the '80s and continue until today. The Butantan Institute is producing a pentavalent vaccine based on a tetravalent reassortant bovine-human rotavirus vaccine (BRV-UK) developed by the NIH (National Institute of Health, USA), composed by genotypes G1-G4 and G9 genotype emergent in Brazil. According to the World Health Organization (WHO) for the live attenuated rotavirus vaccine to be licensed some production tests, quality control and evaluation of safety and efficacy of the vaccine are necessary. These tests must be performed in different stages of vaccine production. This study was conducted to standardized and to implement necessary techniques to titrate and for molecular characterization of vaccine strains and rotavirus vaccine produced by Butantan Institute. After implementation, analysis tests of experimental animal samples were conducted. The tests of virus titration and neutralization were performed with standard samples of the genotypes used in the vaccine and afterwards, the samples were analyzed for titration yielding titers that ranged from  $10^5$  to  $10^7$ . Tests for genetic identity of the vaccine samples showed 99.3% to 100% similarity in relation to standards. Experimental animal samples testing showed seroconversion for genotypes G1, G2, G3 and G4. Viral excretion tests, seven samples were positive for rotavirus and identified as genotype G3P[?]. The standard viral titration and neutralization tests allowed these tests to be used for vaccine samples evaluation and for experimental animal samples tests.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AGMK	Célula primária de rim de macaco verde
BRV	Rotavírus bovino
dATP	Deoxiadenosina trifosfato
dCTP	Desoxicitosina trifosfato
dGTP	Desoxiguanosina trifosfato
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTP	Desoxinucleotídeo trifosfato
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
G	Glutamina
HCl	Ácido clorídrico
IgA	Imunoglobulina A
MA104	Célula heteroplóide de rim de macaco rhesus
NIH	<i>National Institute of Health</i>
nm	Nanômetro ( $10^{-9}$ Metro)
NSP	Proteínas não estruturais
ORF	<i>Open Reading Frame</i> (quadro aberto de leitura)
P	Protease
PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida
pb	Pares de bases
PFU	Unidade Formadora de Placa
PM	Peso molecular
PRN	Neutralização da Redução de Placa
RNA <sub>df</sub>	Ácido ribonucléico de dupla fita
RRV	Rotavírus símio (Rhesus)
RT-PCR	Transcrição reversa – Reação em Cadeia pela Polimerase
SDS	Sulfato duodecil de sódio
Stop codon	Código terminador
Taq DNA	Enzima DNA polimerase
TBE	Tris - Ácido bórico - EDTA
TRO	Terapia de Reidratação Oral
TRV	Terapia de Reidratação Intravenosa

UV	Ultravioleta
VP	Proteínas virais estruturais
Xg	Força centrífuga gerada em unidades de gravidade

## ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

- FIGURA 1.** Eletroforese em gel de poliacrilamida apresentando os 11 segmentos do 21  
genoma de rotavírus SA11 (RNAdf segmentado) (à esquerda) e as proteínas codificadas  
por esses genes, proteínas estruturais (VP) e proteínas não-estruturais (NSP) (ao centro);  
esquema da partícula de rotavírus apresentando a localização das proteínas estruturais  
(direita, superior); reconstrução em terceira dimensão da partícula de rotavírus. As cores  
nas partículas esquematizadas representam as proteínas estruturais VP4 (vermelho), VP7  
(amarelo), VP6 (azul) e VP2 (verde). Fonte: Mossel E, Estes M, Ramig F.  
[http://www.reoviridae.org/dsrna\\_virus\\_proteins//rotavirus%20figure.htm](http://www.reoviridae.org/dsrna_virus_proteins//rotavirus%20figure.htm)
- TABELA 1.** Apresentação das proteínas dos rotavírus, suas características, funções e os 23  
segmentos genômicos que as codificam.
- FIGURA 2.** Representação esquemática da estrutura dos segmentos genômicos do RNAdf 25  
dos rotavírus, a partir das seqüências publicadas dos genes 1 a 11. Adaptado de Estes MK  
e Kapikian AZ.: Rotaviruses. In: Fields Virology, 5th. Fields BN et al. (2007).
- FIGURA 3.** Representação esquemática de reassortant humano-bovino da vacina contra 41  
rotavírus hexavalente com os sorotipos 1, 2, 3, 4, 8 e 9 da VP7. Fonte: Kapikian et al.,  
2005.
- ESQUEMA 1.** Esquema representativo dos testes necessários para produção, controle de 43  
qualidade e avaliação da segurança e eficácia da vacina de rotavírus. Os testes executados  
pelo IAL apresentam-se em amarelo.
- Esquema 2.** Esquema representativo dos testes realizados nos ensaios pré-clínicos contra 45  
a vacina rotavírus. Os testes executados pelo IAL apresentam-se em amarelo.
- TABELA 2.** Oligonucleotídeos utilizados para a caracterização molecular dos rotavírus 50  
referente à proteína VP7 (genótipo G).
- TABELA 3.** Oligonucleotídeos utilizados para a caracterização molecular dos rotavírus 51  
referente à proteína VP4 (genótipo P).
- FIGURA 4.** Método de plaqueamento em cultura celular (PFU/mL). (A) rotavírus genótipo 66  
G9 e (B) rotavírus genótipo G1. As imagens foram obtidas após coloração com cristal de  
violeta.

<b>FIGURA 5.</b> Amostras representativas dos produtos da amplificação de rotavírus vacinais padrão e banco semente, banco primário e protótipos vacinais, observados em gel de agarose: canaletas 1 a 5 - produtos do gene 9; canaletas 6 a 10 - produtos do gene 4; PM - 100 pb – DNA Ladder; B - branco (controle de contaminação).	67
<b>FIGURA 6.</b> Amostras representativas dos genótipos G identificados nas amostras vacinais: canaletas 1-2 (G1); canaletas 3-4 (G2); canaletas 5-6 (G3); canaletas 7-8 (G4); canaletas 9-10 (G9), produtos de PCR observados em gel de agarose; PM - 100 pb – DNA Ladder; B, branco (controle de contaminação).	68
<b>FIGURA 7.</b> Amostras representativas do genótipo P[5] (UK) identificado nas amostras vacinais: canaletas 1 a 10, produtos de PCR (585 pb) observados em gel de agarose; PM - 100 pb – DNA Ladder; B, branco (controle de contaminação).	68
<b>TABELA 4.</b> Análise de similaridade das seqüências de nucleotídeos do gene 9 de amostras vacinais representativas de rotavírus e seqüências padrões.	70
<b>FIGURA 8.</b> Dendograma indicando identidade das seqüências de nucleotídeos de amostras representativas dos genótipos G1, G3, G4 e G9 da vacina contra rotavírus comparadas às seqüências dos respectivos padrões. A escala indica o número de resíduos de nucleotídeos divergentes.	71
<b>TABELA 4a.</b> Análise de similaridade das seqüências de aminoácidos do gene 9 de amostras vacinais representativas de rotavírus e seqüências padrões.	72
<b>TABELA 5.</b> Identidade das seqüências de nucleotídeos do genótipo G2 das amostras vacinais representativas de rotavírus e seqüência padrão G2.	73
<b>FIGURA 9.</b> Dendograma indicando identidade das seqüências de nucleotídeos de amostras representativas do genótipo G2 da vacina contra rotavírus comparadas à seqüência da amostra UK-G2 padrão. A escala indica o número de resíduos de nucleotídeos divergentes.	73
<b>TABELA 6.</b> Análise de similaridade das seqüências de nucleotídeos da amostra UK das amostras vacinais representativas de rotavírus e seqüência padrão UK.	74
<b>FIGURA 10.</b> Dendograma indicando identidade das seqüências de nucleotídeos do gene 4 de amostras representativas da vacina contra rotavírus comparadas à seqüência da amostra padrão UK e amostra padrão NCDV (rotavírus animal). A escala indica o número	75

de resíduos de nucleotídeos divergentes.

**FIGURA 11.** PAGE – perfil eletroforético de amostras representativas dos genótipos utilizados na vacina: canaletas 1 a 5: reassortants UK-G1, UK-G2, UK-G3, UK-G4 e UK-G9; amostras padrão de rotavírus SA11 (rotavírus símio) e UK (rotavírus bovino). 76

**TABELA 7.** Resultados do Teste de Neutralização por Redução de Placas (PRN) contra rotavírus em amostras pareadas de soro de voluntários com gastroenterite com excreção de rotavírus genótipo G1 (caso 1) e G9 (caso 2). 77

**TABELA 8.** Resultados de Neutralização de Redução de Placas (PRN) contra rotavírus em amostras pareadas de soro de coelhos pré e pós-imunização. 78

**TABELA 9.** Resultados de excreção viral em coelhos inoculados com o a vacina contra rotavírus. Amostras de fezes coletadas nos dias D0, D1, D2, D8, D9, D15 e D16. 79

**FIGURA 12.** Produtos de PCR observados em gel de agarose das amostras dos coelhos positivos para rotavírus. Canaletas 1 a 7: genótipos G3 (VP7); PM - 100 pb – DNA Ladder; B, branco (controle de contaminação). 80

**TABELA 10.** Identidade das seqüências de nucleotídeos do genótipo G3 identificados em fezes de coelhos inoculados com rotavírus. 81

**FIGURA 13.** Dendograma indicando identidade das seqüências de nucleotídeos das amostras de genótipo G3 de coelhos inoculados com rotavírus comparadas a seqüência da amostra padrão UK-G3 e amostras padrão UK-G1, UK-G4 e UK-G9 e amostras de coelhos do Genbank: AF528201 e AF528204. A escala indica o número de resíduos de nucleotídeos divergentes. 82

**TABELA 10a.** Identidade das seqüências de aminoácidos do genótipo G3 identificados em fezes de coelhos inoculados com rotavírus. 83

**FIGURA 13a.** Dendograma indicando identidade das seqüências de aminoácidos das amostras de genótipo G3 de coelhos inoculados com rotavírus comparadas a seqüência da amostra padrão UK-G3 e amostras de coelho do GenBank: AF528201 e AF528204. A escala indica o número de resíduos de nucleotídeos divergentes. 84

**FIGURA 14.** Seqüências de aminoácidos deduzidas de nucleotídeos do gene 9 das amostras de coelhos inoculados com rotavírus. Comparação entre as amostras estudadas 85

e a amostra padrão UK-G3 e amostras de rotavírus de coelho encontradas no GenBank. Os retângulos representam respectivamente as regiões antigênicas hipervariáveis A, B, C, D, E e F do gene 9 dos rotavírus

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	17
1.1. Diversidade dos rotavírus e implicações para desenvolvimento das vacinas	20
1.2. Epidemiologia	28
1.3. Patogênese	30
1.4. Imunidade	32
1.5. Transmissão, Doença e Tratamento	33
1.6. Propagação em culturas celulares	35
1.7. Vacinas	36
1.7.1. Primeiras Vacinas	36
1.7.2. Vacinas de amostras de rotavírus humano	37
1.7.3. Vacinas de <i>reassortants</i> animal/humano	38
1.8. Licenciamento de Vacina	42
1.9. Ensaios Pré-Clínicos	44
<b>2. OBJETIVOS</b>	46
2.1. OBJETIVO GERAL	47
2.2. Objetivos específicos	47
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	48
3.1. MATERIAIS	49
3.1.1. Culturas Celulares	49
3.1.2. Vírus	49
3.1.3. Soros padrão	49
3.1.4. Animais	49
3.1.5. Oligonucleotídeos	50
3.2. MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO DA VACINA CONTRA ROTAVÍRUS	51
3.2.1. Manutenção de Culturas Celulares	51
3.2.2. Técnica de titulação viral	52
3.2.2.1. Padronização da titulação de vírus por unidade formadora de placa (PFU)	52

3.2.2.2. Cálculo do PFU	53
3.2.3. Técnicas moleculares	54
3.2.3.1. Extração de RNA	54
2.3.2. Transcrição Reversa - Reação em Cadeia pela Polimerase (RT-PCR)	55
3.2.3.3. Genotipagem	56
3.2.3.4. Sequenciamento genético	57
3.2.3.5. Análise de seqüências de nucleotídeos	58
3.2.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA)	58
<b>3.3. MÉTODOS UTILIZADOS NOS ENSAIOS PRÉ-CLÍNICOS</b>	<b>59</b>
3.3.1. Técnicas de neutralização	59
3.3.1.1. Padronização da Soroneutralização por Redução de Placa (PRN)	60
3.3.1.2. Cálculo de PRN	61
3.3.2. Técnicas moleculares	61
3.3.2.1. Extração de RNAdf com Trizol®	61
3.2.6. ELISA	62
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>64</b>
4.1. Resultados das análises da vacina contra rotavírus	65
4.1.1. Padronização de técnicas de plaqueamento	65
4.1.2. Implantação dos testes de potência nas amostras vacinais	66
4.1.3. Técnicas moleculares para testes de identidade genética	67
4.1.4. Sequenciamento genômico das amostras vacinais	69
4.1.5. Análise do perfil eletroforético	75
4.2. Resultados dos testes pré-clínicos de excreção e presença de anticorpos neutralizantes em animais	77
4.2.1. Padronização da técnica de neutralização de redução de placas	77
4.2.2. Implantação da reação de neutralização de redução de placas	78
4.2.3. ELISA	78
4.2.4. Técnicas moleculares para testes de identidade genética	79
4.2.5. Sequenciamento genômico das amostras animais	80
<b>5. DISCUSSÃO</b>	<b>87</b>
<b>6. CONCLUSÕES</b>	<b>98</b>



## *1. INTRODUÇÃO*

## 1. INTRODUÇÃO

Os rotavírus são considerados como os agentes virais mais importantes associados às diarreias agudas graves, de distribuição mundial, acometendo seres humanos, várias espécies de mamíferos e aves. A principal via de transmissão do vírus é fecal-oral, mas algumas evidências indicam a possibilidade de transmissão respiratória (Estes e Kapikian, 2007).

Nos países desenvolvidos, os rotavírus são responsáveis por 40 a 60% dos casos de diarreia aguda grave, embora mortes sejam raras (Estes e Kapikian, 2007); nos países em desenvolvimento, a diarreia por rotavírus permanece como uma das principais causas de morte em crianças menores de 2 anos, embora evidências demonstrem o declínio da mortalidade na última década (Parashar *et al.*, 2006).

Tanto nos países desenvolvidos como nos países em desenvolvimento, a diarreia gera alto custo para a sociedade devido à demanda por serviços médicos, atendimento ambulatorial, pronto atendimento e hospitalizações, além de perdas de dias de trabalho e escola, gastos com medicamento e transporte e, é claro, dano à saúde (Parashar *et al.*, 2006). Estudo de custo e incidência da diarreia por rotavírus realizado em segmento da população do estado de São Paulo (Soarez *et al.*, 2008) demonstrou que uma criança com diarreia onera o SUS (Sistema Único de Saúde) em R\$50 por dia.

Estudos sobre a etiologia das gastroenterites agudas realizados no Brasil demonstraram a presença de rotavírus, norovírus, adenovírus entérico e astrovírus, sendo que os rotavírus foram os agentes virais mais comuns associados a casos de diarreia aguda, variando de 11 a 20% em diferentes regiões do país (Castro *et al.*, 1994, Timenetsky *et al.*, 1994, Carvalho-Costa *et al.*, 2006, Linhares 1997, Carmona *et al.* 2004, Nakagomi *et al.*, 2008).

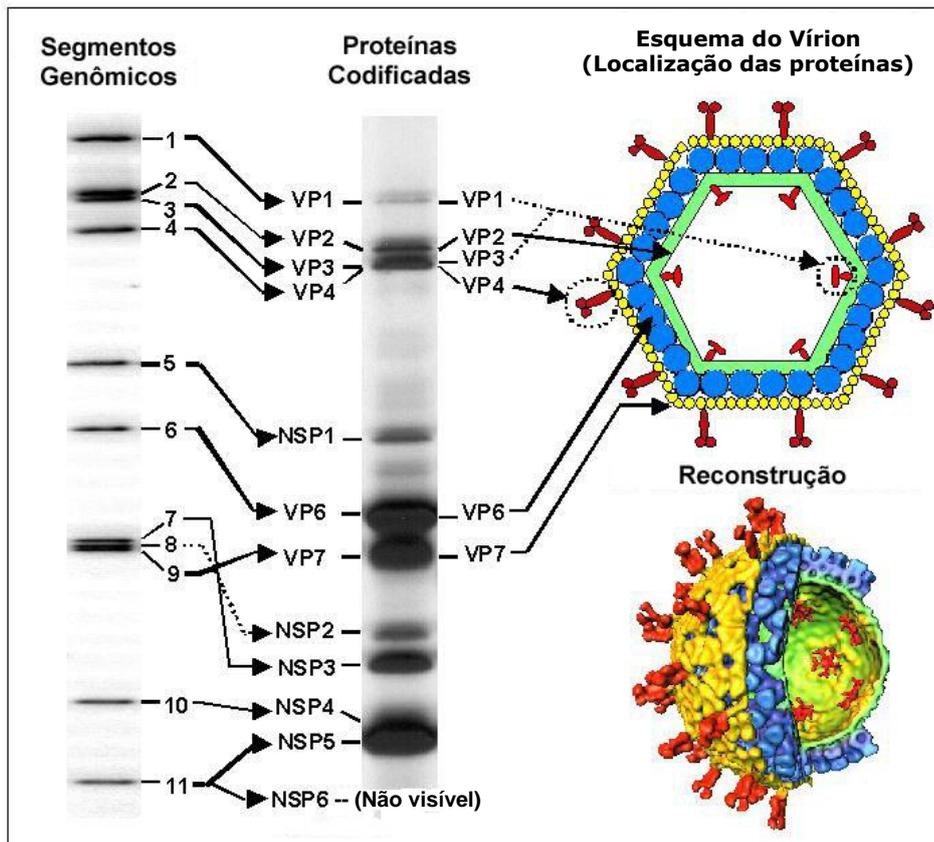
No Brasil, a sazonalidade é variável com maior incidência de rotavírus nos meses mais frios ou secos (maio-setembro) nas regiões central e sudeste, enquanto que nas regiões norte e nordeste sua ocorrência é distribuída igualmente ao longo do ano (Linhares 1997).

No Brasil, a morbi-mortalidade devido à doença diarréica diminuiu consideravelmente a partir da década de 70 devido à implantação de medidas públicas como melhoria no saneamento básico, incentivo ao aleitamento materno e a introdução da terapia de reidratação oral (Guerrant *et al.*, 2003). Por outro lado, a diarréia provocada por rotavírus, tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento, não apresentou redução significativa após a introdução dessas medidas (Leite *et al.*, 1996). Anualmente, estima-se que ocorram 130 milhões de casos de diarréia por rotavírus, provocando 611.000 mortes, o que representa 5% de todas as mortes de crianças abaixo dos cinco anos e 2 milhões de hospitalizações. De fato, nos países em desenvolvimento, cerca de 1.205 crianças morrem diariamente por rotavírus (Parashar *et al.*, 2003, 2006). Na América Latina estima-se que ocorram cerca de 75.000 hospitalizações e 15.000 mortes por ano em crianças devido ao rotavírus (Araújo *et al.*, 2007). Estudos preliminares indicam que ocorrem ao menos 2.000 mortes relacionadas à rotavírus anualmente no Brasil entre crianças com menos de 5 anos (Araújo *et al.*, 2007).

Diante desse cenário, considerou-se prioridade o desenvolvimento de vacina contra rotavírus. Os esforços para o desenvolvimento de vacinas contra rotavírus começaram no início da década de 80 e continuam até hoje. Em agosto de 1998, nos Estados Unidos da América (EUA), foi licenciada a primeira vacina contra rotavírus, denominada RRV-TV (Rotashield<sup>®</sup>, Wyeth-Lederle Vaccines and Pediatrics, PA, EUA), sendo retirada do mercado após 1 ano devido à associação com maior risco de casos de intussuscepção. Atualmente, três vacinas licenciadas estão sendo comercializadas em todo o mundo: a Rotateq<sup>®</sup> (Merck, Inc, EUA), RIX4414 (Rotarix<sup>®</sup>, GlaxoSmithKline Biologicals, Bélgica), e a Rotashield<sup>®</sup> (RRV-TV, BioVirx, EUA) após testes de segurança; outras vacinas estão em desenvolvimento (Ruiz-Palacios *et al.*, 2006, Vesikari *et al.*, 2006, Hyser e Estes, 2008).

## 1.1. DIVERSIDADE DOS ROTAVÍRUS E IMPLICAÇÕES PARA DESENVOLVIMENTO DAS VACINAS

Os rotavírus são classificados como um gênero da família *Reoviridae*. A partícula completa apresenta aproximadamente 70nm de diâmetro, nucleocapsídeo com simetria icosaédrica e sem envoltório. O capsídeo viral é formado por três camadas protéicas: externa, intermediária e interna. A camada interna (core) contém o genoma viral que consiste de RNA de fita dupla (RNA<sub>df</sub>), segmentado. Os 11 genes podem ser separados por eletroforese em gel de poliacrilamida apresentando padrão de migração em relação ao seu peso molecular (**Figura 1**), específicos para cada grupo de rotavírus. De acordo com a ordem de migração os 11 segmentos são distribuídos em 4 classes (Lourenço *et al*, 1981). Os RV do grupo A apresentam o padrão de migração 4:2:3:2, correspondente a: Classe I (genes 1,2, 3 e 4); Classe II (genes 5 e 6); Classe III (genes 7, 8 e 9) e Classe IV (genes 10 e 11). Os genes 10 e 11 podem apresentar posições diferentes de acordo com a maior ou menor velocidade de migração, caracterizando-se em padrões eletroforéticos “longo”, “curto” e “super curto” (Lourenço *et al*, 1981).



**Figura 1:** Eletroforese em gel de poliacrilamida apresentando os 11 segmentos do genoma de rotavírus SA11 (RNA<sub>df</sub> segmentado) (à esquerda) e as proteínas codificadas por esses genes, proteínas estruturais (VP) e proteínas não-estruturais (NSP) (ao centro); esquema da partícula de rotavírus apresentando a localização das proteínas estruturais (direita, superior); reconstrução em terceira dimensão da partícula de rotavírus. As cores nas partículas esquematizadas representam as proteínas estruturais VP4 (vermelho), VP7 (amarelo), VP6 (azul) e VP2 (verde). Fonte: Mossel E, Estes M, Ramig F.

[http://www.reoviridae.org/dsrna\\_virus\\_proteins//rotavirus%20figure.htm](http://www.reoviridae.org/dsrna_virus_proteins//rotavirus%20figure.htm)

Estes genes codificam tanto proteínas virais estruturais (VP), quanto proteínas não estruturais (NSP), sendo codificado o total de 6 VP e 5 NSP (Estes e Kapikian, 2007). O genoma segmentado dos rotavírus permite

*reassortant* durante as coinfeções, uma propriedade que é usada no desenvolvimento de vacinas (Kang G, 2006).

As proteínas estruturais VP1, VP2 e VP3, codificadas pelos genes 1, 2 e 3, respectivamente, encontram-se no capsídeo interno; a proteína VP6, é codificada pelo gene 6, compõe o capsídeo intermediário (Zhou *et al.*, 2003). A associação da VP6 à VP2 confere à partícula viral maior homogeneidade morfológica e estabilidade de longo prazo, o que sugere que a VP6 seja a maior responsável pela integridade da estrutura da partícula dos rotavírus (Zeng *et al.*, 1994). A camada mais externa do capsídeo é composta por 2 proteínas de superfície, VP7 e VP4. A VP7 é uma glicoproteína codificada pelos genes 7, 8 ou 9, de acordo com a espécie animal; a VP4 é uma proteína pretease-dependente codificada pelo gene 4 (**Tabela 1**). Estas duas proteínas induzem a formação de anticorpos neutralizantes e, portanto, são consideradas críticas para o desenvolvimento de vacinas (Estes e Kapikian, 2007).

A proteína VP7 codificada pelo gene 9 contém seis regiões sorotipo-específicas denominadas de A a F, constituídas de aminoácidos altamente conservados entre as cepas do mesmo sorotipo, porém com variações entre cepas de diferentes sorotipos. As regiões variáveis A (aa residuais 87 a 101), B (aa residuais 143 a 152) e C (aa residuais 208 a 221) são responsáveis pela codificação dos epítomos neutralizantes, sendo a região C considerada o sítio antigênico mais imunogênico da VP7 (Estes e Kapikian, 2007).

As proteínas NSP1 e NSP4 são codificadas pelos genes 5 e 10, respectivamente; as proteínas NSP5 e NSP6, pelo gene 11, e as proteínas NSP3 e NSP2, pelos genes 7, 8 ou 9, dependendo da amostra de vírus. As proteínas NSP1, NSP3 e NSP5 estão envolvidas na replicação do genoma viral (Estes e Kapikian, 2007). A proteína NSP4 foi descrita como sendo uma enterotoxina viral (Ball *et al.*, 1996).

**Tabela 1:** Proteínas dos rotavírus, características, funções e segmentos genômicos.

Segmento genômico	Produto da proteína <sup>a</sup>	Polipeptídeo (Peso molecular x 1000) <sup>b</sup>	Proteína madura modificada	Localização na partícula viral	Nº de moléculas por virion <sup>c</sup>	Grupo mutante Ts <sup>d</sup>	Função
1	VP1	125	-	Core	12	C	RNA-dependente RNA polimerase, ligação do ssRNA; complexo com VP3.
2	VP2	94	-	Core	120	F	Ligação do RNA, necessário a atividade de replicase da VP1.
3	VP3	88	-	Core	12	B	Guanilil e metil transferase, ligação do ssRNA, complexo com a VP1.
4	VP4	86.7	Clivado em VP5* (529) VP8* (247) <sup>e</sup>	Cápside externo	120	A	Hemaglutinina, adesão celular, antígeno neutralizante, aumenta infectividade, virulência, região de fusão putativa
5	NSP1 (NS53)	58.6	-	Não estrutural		NA	Básica, rica em cisteína (zinc finger), ligação do RNA, virulência em ratos, interage e degrada IRF-3, não essencial para algumas amostras
6	VP6	44.8	-	Cápside interno	780	G	Hidrofóbica, trimérica, antígeno de subgrupo, proteção (neutralização intracelular); necessária para transcrição
7	NSP3 (NS34)	34.6	-	Não estrutural		NA	Ácido dimérico, ligação de 3' do mRNA viral, compete com PABP celular para interação com eIF-4G1, inibe tradução do hospedeiro
8	NSP2 (NS35)	36.7	-	Não estrutural		E	Básica, ligação do RNA, oligomérica, NTPase, helicase, forma viroplasma com NSP5
9	VP7	37.4	Glicosilação do peptídeo clivado	Cápside externo	780	NA	Glicoproteína integral da membrana do RER, trímero cálcio-dependente, antígeno neutralizante
10	NSP4 (NS20)	20.2	NS29-NS28 peptídeos não clivados com alta glicosilação de manose	Não estrutural		NA	Glicoproteína transmembrana RER, receptor intracelular para DLPs, papel na morfogênese, interage com viroplasma, modula cálcio intracelular e replicação do RNA, enterotoxina, secreta produto clivado, proteção por anticorpo, virulência
11	NSP5 (NS26)	21.7	28k, O-glicosilado, fosforilado (Formas diferentes)	Não estrutural		NA	Fosfoproteína básica, ligação do RNA, proteína quinase, forma viroplasma com NSP2, interage com VP2 e NSP6
	NSP6	12	desconhecido	Não estrutural		NA	Interage com NSP5, presente em viroplasma e na maioria das amostras virais

<sup>a</sup>Os polipeptídeos do virion são designados como proposto por Mason et al. e modificado por Liu et al. e Mattion. VP3 é o produto de proteína do gene segmento 3 e VP4 é o produto de proteína do gene segmento 4. Estudos falharam pois identificar equivocadamente o produto de proteína do genoma segmento 3; por esta razão, o produto de proteína do genoma segmento 4 foi chamado de VP3 em publicações antigas. Quando o produto da proteína do genoma do segmento 3 foi confirmado como proteína estrutural localizada no cápside interno, o produto do genoma 3 foi nomeado como VP3 e do genoma 4 foi renomeado VP4. Em 1994, as proteínas não estruturais foram renomeadas NSP1 a NSP5 para facilitar comparações entre estas proteínas de linhagens diferentes de vírus, e esta nomenclatura é aceita atualmente. O parêntese nesta tabela apresenta os nomes das proteínas não estruturais como designado previamente (NS seguido do número indicando seu aparente peso molecular em milhares determinado por eletroforese em gel de poliácridamida contendo dodecil sulfato de sódio). A NSP6 foi caracterizado em 1994.

<sup>b</sup>Pesos moleculares são de proteínas SA11 e são calculados a partir de seqüências de aminoácidos deduzidos das seqüências de nucleotídeos e da ORF (*Open Reading Frame*) potencialmente maior.

<sup>c</sup> Calculado de estudos estruturais de virions purificados

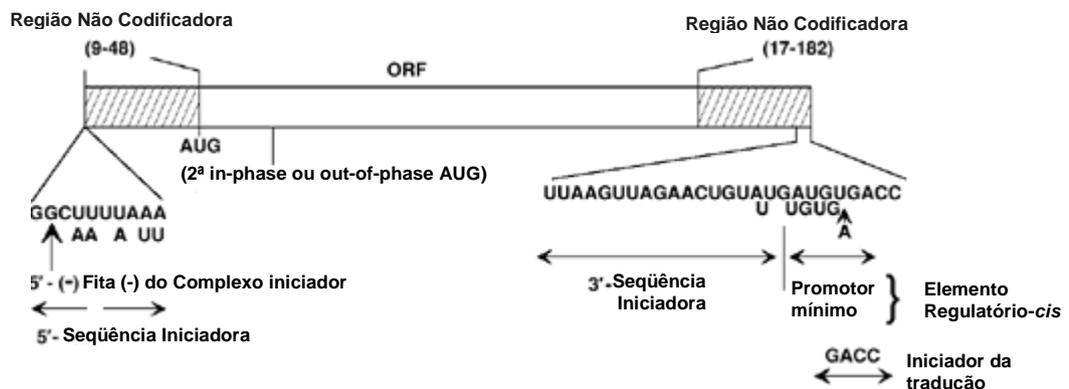
<sup>d</sup> NA, sem designação mutante. Quatro grupos de mutantes sensíveis a temperatura (tsD, tsH, I, J) ainda não são mapeados em segmento genômico

<sup>e</sup> Três sítios de clivagem de tripsina são encontrados na VP4 do SA11 nos aminoácidos 231, 241 e 247. Os produtos maduros indicados são baseados no uso somente do segundo sítio de clivagem.

Adaptado de Estes MK e Kapikian AZ. In: *Fields Virology*, 5th ed. Fields B. N. et al., 2007.

O genoma dos rotavírus é rico em A+U, aproximadamente 58-67% do genoma é composto por estes nucleotídeos. Os segmentos possuem um *cap* na extremidade 5' da fita de polaridade positiva. Além disso, todos os segmentos são pareados de ponta a ponta, o que lhes confere maior estabilidade (Estes e Kapikian, 2007).

O esquema dos segmentos do RNA<sub>df</sub> dos rotavírus está representado na **Figura 2**. Cada fita de polaridade positiva inicia-se com uma guanidina na porção 5', seguida de um grupo de nucleotídeos de seqüências conservadas, que corresponde à região 5' não codificadora, seguida pelo códon de iniciação e pela seqüência codificadora da proteína (ORF – *Open Reading Frame*). No final de cada fita outro grupo de seqüências conservadas não codificadora na porção terminal 3', com duas citosinas, seguida de um código terminador (*stop codon*). Quase todos os RNAm têm uma seqüência consenso 5'-UGUGACC-3', que contém sinais para a expressão e replicação gênica. Todos os segmentos genômicos possuem pelo menos um ORF após o códon de iniciação para síntese protéica (AUG) e, com exceção do gene 11, são monocistrônicos (Estes e Kapikian, 2007).



**Figura 2:** Representação esquemática da estrutura dos segmentos genômicos do RNA<sub>df</sub> dos rotavírus, a partir das seqüências publicadas dos genes 1 a 11. Adaptado de Estes MK e Kapikian AZ.: Rotaviruses. In: *Fields Virology*, 5th. Fields BN *et al.* (2007).

O comprimento total das seqüências não codificadoras das regiões 3' e 5' podem variar de gene para gene, porém as seqüências de amostras homólogas são altamente conservadas, o que sugere que contenham importantes informações sobre a replicação viral, como sinais para transcrição, transporte e empacotamento do RNA e montagem da partícula (Estes e Kapikian, 2007).

Os rotavírus apresentam três especificidades antigênicas: grupo, subgrupo e sorotipo. As especificidades de grupo e subgrupo são mediadas principalmente pela VP6, que é a principal proteína do capsídeo. São reconhecidos, até o momento, 7 grupos (A-G) de rotavírus distinguíveis em humanos e animais. Os rotavírus do grupo A são os principais responsáveis por gastroenterite aguda grave em crianças de países desenvolvidos e em desenvolvimento, sendo considerado o grupo de maior importância epidemiológica em humanos. Os rotavírus do grupo B, que também infectam humanos, apresentam importância epidemiológica na China e Bangladesh, onde são associados a epidemias anuais de diarreia grave principalmente em adultos. O grupo C, no entanto, são primariamente patógenos suínos e causam surtos esporádicos em crianças em todo o mundo (Estes e Kapikian, 2007). Recentemente foram descritos rotavírus humanos não classificados nos grupos A, B ou C (Yang *et al.*, 2004, Alam *et al.*, 2007), sendo proposto novo grupo para o gênero rotavírus (Nagashima *et al.*, 2008).

Dois subgrupos (I e II) podem ser identificados dentro do grupo A por determinação de anticorpos monoclonais (Estes e Kapikian, 2007). Em humanos são identificados, mais freqüentemente amostras dos subgrupos I e II. Trabalhos com rotavírus animais tem identificado amostras de origem animais com especificidade para ambos os grupos I e II e outras, sem especificidade para ambos os subgrupos, que são denominadas subgrupo não I e não II (Hoshino *et al.*, 1987; Hoshino e Kapikian, 1994).

As principais proteínas estruturais, VP4, VP6 e VP7, atuam como antígenos na indução de anticorpos neutralizantes, gerando resposta imune protetora. Com base na especificidade antigênica das proteínas VP4 e VP7, os rotavírus do grupo A podem ainda ser classificados em sorotipos e

genótipos. Os sorotipos são determinados pela reatividade dos vírus em ensaios de neutralização e os genótipos, por amplificação e sequenciamento dos genes que codificam essas proteínas. Os sorotipos e genótipos determinantes da VP7 são coincidentes, sendo representados pela inicial G (glicoproteína) seguida por um número (por exemplo, G1). A proteína VP4 diverge quanto à classificação de sorotipo e genótipo, sendo descrita pela inicial P (protease-dependente) seguida por um número (referente ao sorotipo) e outro número entre colchetes (referente ao genótipo), por exemplo: P8[11]. Os genótipos P (VP4) e G (VP7) são determinados por métodos moleculares (Estes *et al.*, 2007).

Até o momento os rotavírus do grupo A são genotipados em 19G (VP7) e 27P (VP4) tipos (Matthijnssens *et al.*, 2008). Os tipos G1 a G4 são os mais comuns e utilizados para o desenvolvimento de vacinas. O tipo G9, prevalente na Índia, emergiu em vários países a partir do final da década de 90, predominando no Brasil no período de 2003 a 2005 (Santos e Hoshino, 2005, ZHOU *et al.*, 2001, 2003, Timenetsky *et al.*, 2004). O tipo G8 tem sido prevalente na África e o tipo G12 está emergindo em várias regiões, como Índia e Brasil. Os rotavírus tipos G6 e G10, que eram exclusivamente patógenos bovinos, foram detectados em crianças com quadro de diarreia (Kapikian e Chanock, 1996, Santos *et al.*, 1998). O tipo G5, reconhecido como patógeno de suínos em vários países, foi pela primeira vez encontrado em amostras de fezes diarreicas de crianças brasileiras (Timenetsky *et al.*, 1994, Gouvea *et al.*, 1994a). Este genótipo foi também descrito em crianças com diarreia aguda no Paraguai, Camarões, Argentina, Vietnam e China, sugerindo que esse genótipo, embora incomum, tem distribuição mundial (Esona *et al.*, 2009).

As combinações mais comuns encontradas em humanos são: P[8]G1, P[4]G2, P[8]G3 e P[8]G4. O Brasil apresenta sorotipos incomuns tais como P[8]G5, P[6]G2, G8 e G10, além de infecções mistas e um número significativo de linhagens não identificadas (Araujo *et al.*, 2001, Timenetsky *et al.*, 1994, Leite *et al.*, 1996). Recentemente, uma nova combinação

G5P[7] foi identificada em crianças com diarreia em Camarões, África (Esona *et al.*, 2009).

A diversidade genética dos rotavírus envolve dois mecanismos principais. O primeiro é o acúmulo de mutações que geram linhagens genéticas diversas, e levam ao surgimento de mutantes que não são necessariamente reconhecidos pelos anticorpos. O segundo mecanismo é o *shift* genético, onde mudanças de material genético por meio de *reassortants* de genes ocorrem durante a coinfeção de uma única célula. Esta diversidade genética e a capacidade dos rotavírus de rápida evolução sugerem que as vacinas devem prover boa proteção heterotípica para serem efetivas em diferentes regiões geográficas (Kang, 2006).

Muitas espécies animais, como, por exemplo, primatas e bovinos, são susceptíveis a infecções por rotavírus, porém estas amostras diferem das humanas. Embora as amostras humanas de rotavírus que possuam alto grau de identidade genética com amostras animais, demonstrem transmissão animal-humana, essa transmissão parece ser incomum. No entanto, *reassortants* de amostras animal-humano são identificadas em pessoas e alguns deles estão sendo utilizados no desenvolvimento de vacinas (Parashar e Cortese, 2009).

Para de determinar um novo sorotipo de rotavírus deve-se considerar os seguintes critérios: diferença de 20 vezes ou mais no título de anticorpos neutralizantes entre o sorotipo referência e o novo; análise e comparação das seqüências de aminoácidos dos genes codificados das proteínas VP7 e VP4 apresentando <89% de identidade (Estes e Kapikian, 2007).

## **1.2. EPIDEMIOLOGIA**

A epidemiologia do grupo A de rotavírus é complexa, devido aos diferentes genótipos G e P circulantes nas mesmas regiões geográficas.

Globalmente, os rotavírus do grupo A são reconhecidos como os enteropatógenos mais comumente identificados entre crianças hospitalizadas com desidratação por diarreia.

Segundo o Sistema de Vigilância Epidemiológica do Ministério da Saúde, após a introdução da vacina de rotavírus no calendário infantil em março de 2006, a frequência de rotavírus no Brasil foi estimada em 23,5%; 2.087 de casos positivos para rotavírus em 8.895 pacientes com diagnóstico laboratorial, no período de 2006 a 2007. A proporção de casos de rotavírus variou por região brasileira: 5,8% no Centro-Oeste; 10,4% no Sul; 22,9% no Sudeste; 30,1% no Nordeste e 30,8% na região Norte (MS, 2008).

No ano de 2008, mais de 2 mil amostras de casos de diarreia foram analisadas e 35,9% das amostras foram positivas para rotavírus; a positividade para rotavírus nas regiões Centro-Oeste, Sul, Sudeste, Nordeste e Norte de 26,4%, 23,6%, 13,3%, 57,9% e 33,3%, respectivamente (MS, 2008).

Os genótipos identificados entre os anos de 2006 e 2008 variaram de acordo com o Estado, mas os mais frequentes foram: G2P[4], G1P[8], G9P[8] e G3PnT (não tipado), com predominância do G2P[4].

Estes dados brasileiros representam um panorama pós-implantação da vacinação contra rotavírus no Programa Nacional de Imunização Brasileiro. A aplicação da vacina contra rotavírus iniciou-se em março de 2006 (<http://portal.saude.gov.br/saude>). A partir desta data, o Ministério da Saúde oferece por meio do Sistema Único de Saúde (SUS), a vacina contra rotavírus (Rotarix<sup>®</sup>) ministrada em duas doses: uma aos 2 meses e outra aos 4 meses de idade. Deve ser observada a idade mínima de 1 mês e quinze dias de vida (6 semanas) e máxima de 3 meses e 15 dias (14 semanas) para aplicação da primeira dose da vacina. Para a segunda dose, a idade mínima deve ser de 3 meses e 15 dias (14 semanas) e máxima de 5 meses e 15 dias de vida (24 semanas) (CVE 2006).

A recomendação é de que a administração experimental da primeira dose da nova geração de vacinas contra rotavírus seja restrita a crianças

nos primeiros 3 meses de vida, uma vez que este grupo de idade é menos vulnerável a ocorrência de intussuscepção natural (Simonsen *et al.*, 2005).

### **1.3. PATOGENESE**

A infecção por rotavírus pode ser assintomática ou produzir sintomas que variam de diarreia branda à aguda, até quadro de desidratação que pode levar à morte (Estes e Kapikian, 2007). A patogênese do rotavírus não é completamente entendida e é necessário lembrar que ela tem sido revelada por estudos em modelos animais. A ocorrência de sintomas e sua gravidade estão relacionadas com a idade, o estado nutricional, imunidade do hospedeiro e potencial de patogenicidade da cepa utilizada (Linhares e Bresse, 2000).

As manifestações clínicas mais observadas na infecção por rotavírus são diarreia, vômito, febre, desidratação e dor abdominal. O período de incubação do vírus dura de 1 a 2 dias e a duração dos sintomas variam em média 4 a 7 dias (Desselberger *et al.*, 2009).

O estudo da patogenia das infecções por rotavírus sugere que este processo seja considerado um evento de múltiplos fatores, relacionados à partícula viral, ao hospedeiro e fatores do próprio processo diarreico (má absorção, resultante de danos iniciais causados pela infecção viral no epitélio intestinal, fatores relacionados à síntese e ação da NSP4 e fatores relacionados ao sistema nervoso entérico). Todos estes fatores devem ser considerados para o melhor entendimento da patogenia (Ramig 2004).

Os rotavírus se multiplicam nos enterócitos maduros próximos às vilosidades intestinais, o que sugere que a diferenciação dos enterócitos é fator necessário para a infecção e replicação viral. Em diversos modelos são observadas alterações microscópicas, como, atrofia das vilosidades, hipertrofia da cripta, presença de microvilosidades irregulares, infiltração de células mononucleares moderada na lâmina própria, dilatação das cisternas do retículo endoplasmático, dilatação mitocondrial, escassez das

microvilosidades (Kapikian 1997). Devido à perda das células maduras das vilosidades, a migração das células da cripta é acelerada. Estas células que migram das criptas para o topo das vilosidades apresentam deficiência na produção de dissacaridases e na absorção, devido à imaturidade (Ramig 2007). Este processo altera completamente as funções do epitélio presente no intestino delgado, levando à diarreia do tipo osmótica, que inclui a diminuição da absorção de sais e água relacionada à perda da capacidade de absorção, atividade normalmente executada pelos enterócitos maduros. A má absorção resulta no trânsito e não digestão dos monossacarídeos e dissacarídeos, carboidratos, gorduras e proteínas pelo cólon. Sugere-se que a má absorção e os danos causados ao epitélio sejam resultado não só da infecção das células da cripta, mas também da isquemia das vilosidades (Graham e Estes, 1991).

A presença de algumas proteínas também parece ser importante para a determinação da patogenicidade. A proteína NSP4 é descrita como um importante determinante da patogenicidade em diversos sistemas, além dos produtos de outros genes estruturais (VP3, VP4 e VP7) e não estruturais (NSP1 e NSP2) que também parecem ser importantes (Ramig 2007).

A proteína NSP4 possui atividade semelhante à de enterotoxinas bacterianas, já que ela provavelmente interage na mediação da diarreia, afetando locais do intestino ainda não infectados pelo vírus (Ramig 2004). Esta proteína promove a alteração na membrana do retículo endoplasmático rugoso (RER) levando a saída de íons  $\text{Ca}^{2+}$  do interior do RER, o que promove um aumento da concentração destes íons no interior do citoplasma celular, que acarreta a ruptura do citoesqueleto das vilosidades (Jourdan *et al.*, 1998). Causa ainda a diminuição da síntese de dissacarídeos, diminuição da síntese de enzimas digestivas pelas células apicais e também a inibição do transporte de  $\text{Na}^+$  e outros solutos. Estas reações contribuem para a redução da capacidade de absorção do epitélio (Ramig 2004).

O estudo da infecção sistêmica por rotavírus somente é possível em locais com procedimento de coleta de amostra minimamente invasivo: biópsia de duodeno, amostras de sangue, soro e líquido. Por isso, são

utilizados modelos animais. Nos modelos animais (camundongos, porcos, bezerras) o rotavírus migra do intestino, entra na circulação e infecta os tecidos periféricos. Ele está associado a infecções em imunocomprometidos causando doenças hepatobiliares. Parece que o rotavírus utiliza a via linfática para escapar do intestino e infectar outros órgãos como o pâncreas, pulmões, rins e fígado nos modelos animais (Ramig 2007).

Fatores relacionados ao indivíduo infectado também parecem ser importantes na determinação da intensidade da diarreia durante infecção por rotavírus. A má nutrição pode ser relacionada à gravidade da infecção, causando retardo na recuperação das células intestinais e também, uma resposta inflamatória diferente. Além disso, a idade também é fator importantíssimo, visto que a maior ocorrência de infecções por rotavírus em recém-nascidos pode estar relacionada aos baixos níveis de produção de proteases, que são necessárias à clivagem da proteína VP4 e a imunidade, pois a produção de anticorpos neutralizantes aumenta com a idade e exposição ao vírus. A idade também está relacionada à produção de muco intestinal, à taxa de renovação das células epiteliais e conseqüente absorção de fluídos, fatores que afetam a infecção por rotavírus (Ramig 2004).

#### **1.4. IMUNIDADE**

Embora muitos estudos sejam feitos para se entender a imunidade na infecção por rotavírus utilizando humanos e outros animais, os mecanismos de proteção contra infecção por rotavírus não são muito bem compreendidos. Sabe-se que a proteção clínica pode envolver anticorpos locais e sistêmicos e o sistema imune de células mediadoras (Linhares e Bresee 2000).

Em crianças, os anticorpos neutralizantes contra o sorotipo G da amostra infectante (resposta homotípica) se desenvolvem após infecção primária do rotavírus. Repetidas infecções por rotavírus fazem surgir respostas homotípicas e heterotípicas (contra amostras com diferentes

sorotipos G). A proteção contra diarreia por rotavírus está correlacionada com o título de anticorpos no soro das crianças, e crianças infectadas são mais protegidas contra reinfecção com sorotipos G similares (Parashar *et al.*, 1998).

Os anticorpos contra VP6 em secreções são indicativos da habilidade da imunoglobulina A (IgA) neutralizar o vírus, gerando imunidade de mucosa e resistência à reinfecção. Anticorpos nas fezes são sujeitos à degradação proteolítica e não são considerados marcadores para infecção e, como os fluidos intestinais são difíceis de obter das crianças, a mensuração dos títulos de imunoglobulina IgA do soro é um substituto para verificar a imunidade local. Por este motivo, a IgA tem sido escolhida para determinação da resposta de anticorpos nas vacinas testadas em todo o mundo (Xu *et al.*, 2005).

Embora a proteção relacionada ao aleitamento materno seja discutida, há estudos que demonstram que mães de neonatos não infectados possuem maior quantidade de anticorpos neutralizantes rotavírus-específicos no colostro e leite do que mães de neonatos infectados. Alguns autores afirmam que os fatores de proteção não imunológica presentes no leite materno, como as glicoproteínas tipo mucina, inibem a infecção por rotavírus (Yolken *et al.*, 1992).

A influência da imunidade mediada pela célula é pouco entendida, mas provavelmente, está relacionada com a proteção à infecção e à doença subsequente (Yolken *et al.*, 1992).

## **1.5. TRANSMISSÃO, DOENÇA E TRATAMENTO**

A diarreia aguda é uma doença disseminada por contaminação fecal-oral, pessoa a pessoa e pela ingestão de água e alimentos contaminados. Também há possibilidade de transmissão por via aérea (Kapikian e Chanock 1996).

A eficiência de transmissão dos rotavírus pode estar ligada a sua resistência à inativação, eliminação de grande número de partículas nas fezes (acima de  $10^{11}$  partículas / mL de fezes) e sua estabilidade à temperatura ambiente (Estes *et al.*, 1979). Por estes motivos, a infecção também pode ser adquirida por meio de mãos, objetos e utensílios contaminados. Excreção de rotavírus assintomaticamente também foi documentada e pode aumentar o risco de infecção. A dose infectante é determinada entre 10-100 partículas virais infectantes (Kapikian e Chanock, 1996).

Após curto período de 1-2 dias de incubação, surge o início da doença. Os sintomas incluem diarreia líquida de 4-7 dias, vômito, febre e desidratação rápida. A gravidade da doença varia de infecção inaparente a infecções do sistema nervoso central e infecções crônicas em imunodeficientes (Desselbeger *et al.*, 2009).

O tratamento da doença é realizado por meio da Terapia de Reidratação Oral (TRO) que tem por objetivo corrigir o desequilíbrio hidroeletrólítico pela reidratação, buscando restabelecer os níveis apropriados de água e eletrólitos que foram reduzidos durante a diarreia, assim como manter e recuperar o estado nutricional. Em casos mais graves, a reidratação intravenosa (TRV) é indicada no atendimento de crianças com desidratação caracterizada por perda de até 5% do peso corporal (Desselbeger *et al.*, 2009).

Os rotavírus que acometem animais são bem estudados. Há diversos casos de transmissão de rotavírus interespecies e principalmente, casos documentados de humanos infectados por rotavírus animal, onde comparações de seqüências genéticas de rotavírus humanos e animais revelam identidade muito próxima. A vigilância da circulação de rotavírus em populações humanas revela a presença de diversos genótipos incomuns. Muitos destes são encontrados em animais domésticos demonstrando a transmissão zoonótica. A baixa incidência de amostras incomuns sugere que a transmissão, ou ao menos o estabelecimento de um rotavírus animal ou um *reassortant* humano/animal em populações humanas não ocorre tão

freqüentemente (Cook *et al.*, 2004). No entanto, milhões de pessoas estão expostas aos rotavírus animais todos os anos.

## 1.6. PROPAGAÇÃO EM CULTURAS CELULARES

Os rotavírus são considerados vírus fastidiosos, necessitando de culturas de células específicas e pré-tratamento para a replicação em cultura celular. Os rotavírus animais, em sua maioria, replicam-se mais facilmente em culturas celulares. Em 1980, Wyatt *et al.*, descreveram a propagação do primeiro rotavírus humano em culturas celulares (amostra Wa sorotipo 1), após pré-tratamento do vírus com tripsina e utilizando passagens seriadas em cultura de célula primária (AGMK). Dois anos depois, Greenberg *et al.* (1982), utilizaram a técnica de *reassortant* genético como estratégia para a propagação de rotavírus humanos. Culturas celulares foram coinfetadas com amostra de rotavírus humano não cultivável e uma amostra de rotavírus bovino mutante, o que resultou em vários *reassortants* cultiváveis, rotavírus humanos não cultiváveis e rotavírus bovino mutante. Os produtos obtidos foram analisados e recuperados, empregando-se 2 tipos de pressão seletiva: os rotavírus bovino-mutantes e os *reassortant* foram selecionados, empregando-se diferentes temperaturas de incubação para o crescimento das culturas inoculadas e os humanos foram selecionados por neutralização específica dos rotavírus bovinos, incubando-se o produto da cultura celular com anticorpo para rotavírus bovino. Os *reassortants* selecionados replicaram eficientemente em culturas celulares, em determinadas temperaturas de restrição, apresentando especificidade de neutralização das cepas não cultiváveis e mistura de genótipos. Dessa forma, os rotavírus humanos foram recuperados, empregando-se a metodologia clássica de neutralização.

Após este experimento, foram desenvolvidas técnicas para o cultivo direto de rotavírus humanos em culturas celulares, com a utilização da tripsina na concentração 10ug/mL para ativação da amostra viral e 1ug/mL

desta no meio de manutenção, temperatura de incubação das amostras a 37°C e culturas de células primárias de rim de macaco verde africano (AGMK) ou culturas de células heteroplóides de rim de macaco rhesus (MA104) em rotação (Kitamoto *et al.*, 1991, Ward *et al.*, 1991).

## **1.7. VACINAS**

### **1.7.1. PRIMEIRAS VACINAS**

Os esforços para desenvolvimento de vacinas contra rotavírus tiveram início na década de 80 e continuam até hoje. A imunidade da infecção por rotavírus foi primeiramente demonstrada por Bishop *et al* (1983) observando que neonatos infectados com rotavírus estavam protegidos contra diarreia aguda após reinfecção. O principal foco do desenvolvimento da vacina contra rotavírus é a administração de amostras de vírus vivo atenuado por via oral.

As primeiras tentativas da vacina envolveram rotavírus bovino, pois foi demonstrado que rotavírus animais e humanos dividem um grupo antigênico comum, particularmente VP6 e que animais imunizados experimentalmente com amostras animais de rotavírus tinham baixo risco de doença (baseado no fato destes serem naturalmente atenuados por seus hospedeiros). Várias vacinas monovalentes de origem animal foram testadas em seres humanos, incluindo a RIT4237 (SmithKline – RIT, Bélgica), de origem bovina, sorotipo G6; a amostra WC3 de origem bovina, sorotipo P7[5]G6 e a MMU18006 (normalmente denominada RRV), de origem símia, sorotipo P[3]G3. Estas vacinas demonstraram alta variabilidade de resultados nos testes vacinais o que foi atribuído à falta de capacidade de indução de proteção contra os 4 tipos G epidemiologicamente importantes. Testes com vacinas animais monovalentes foram, em sua maioria, abandonadas (Kang 2006).

### **1.7.2. VACINAS DE AMOSTRAS DE ROTAVÍRUS HUMANO**

A vacina RIX4414 (Rotarix<sup>®</sup>, GlaxoSmithKline Biologicals, Bélgica), monovalente, P1A[8] G1, derivada da amostra G1 (89-12) humana, demonstrou alta eficiência nos testes vacinais nos EUA e Finlândia. A vacina foi testada na América Latina (México, Brasil e Venezuela) apresentando 86% de eficácia contra doença aguda. Outros testes confirmaram este resultado e demonstraram 85% de eficiência contra hospitalização, como também, eficácia de 75% contra os rotavírus genótipos G3 e G4 e de 45% contra o genótipo G2 (Ruiz-Palacios *et al.*, 2006, De Vos *et al.*, 2004). A vacina Rotarix<sup>®</sup> foi testada em >60.000 crianças de 11 países da América Latina e Finlândia (Jiang *et al.*, 2008). Não houve relatos de efeitos adversos ou aumento do risco de intussuscepção entre as crianças. Atualmente, esta vacina está licenciada na Europa, EUA, México e diversos países da América Latina, Oriente Médio, Ásia e África, sendo administrada gratuitamente no Brasil, dentro do calendário nacional de imunização desde março de 2006.

A vacina RV3, monovalente, foi desenvolvida a partir de uma amostra humana P2A[6] G3, isolada de recém nascidos em Melbourne, Austrália (Ruiz-Palacios *et al.*, 2006). Esta vacina foi baseada na observação de que neonatos infectados com rotavírus em enfermarias normalmente são assintomáticos e estão posteriormente, protegidos contra diarreia aguda nos primeiros anos da infância. Nos primeiros testes de segurança em que uma única dose de vacina foi administrada não houve relato de evento adverso significativo, mas as repostas imunes foram baixas (Das *et al.*, 1994). Teste realizado com três doses da vacina induziu repostas em 54% das crianças e os vacinados que desenvolveram resposta imune foram protegidos contra rotavírus. Esses resultados promissores levaram os fabricantes a aumentarem o título da vacina e retomar os testes clínicos. Atualmente, os lotes da vacina estão sendo preparados para a realização dos testes clínicos de fase I e II.

Dois vírus isolados de recém-nascidos na Índia estão sendo estudados como novos candidatos a vacinas: a amostra 116E (P8[11] G9), isolada em 1985 de um surto de infecção por rotavírus assintomático em Nova Delhi, um *reassortant* natural entre amostra G9 humana e um gene VP4 P8[11] de origem bovina. A seqüência do gene VP4 apresenta homologia ao gene P[11], um genótipo muito encontrado em bovinos. Um surto nosocomial em uma maternidade em Bangalore levou à identificação entre os neonatos de outra amostra de *reassortant* bovino-humano, I321. Ao contrário da amostra 116E, a amostra I321 tinha uma estrutura de nove segmentos de gene bovinos e dois segmentos de genes (5 e 7), que codificam proteínas não-estruturais, de origem humana. Estas amostras estão sendo utilizadas em estudos pré-clínicos e ensaios clínicos em humanos planejados na Índia. Divulgação recente relatou que uma amostra com as mesmas características de G e P da amostra I321 emergiu como causa de diarreia em crianças em Vellore, Índia. Esta nova descoberta demonstra a necessidade de monitoramento e estudos epidemiológicos criteriosos (Kang 2006).

### **1.7.3. VACINAS DE REASSORTANTS ANIMAL/HUMANO**

Vários estudos levaram à concepção que vacinas multivalentes, utilizando cada um dos sorotipos VP7 epidemiologicamente importantes, é necessária para induzir proteção em crianças, população alvo da vacinação. *Reassortants* de rotavírus humano-animal cujos genes codificam a proteína VP7, com ou sem VP4, derivados de rotavírus humanos, com os outros genes derivados de rotavírus animal, foram desenvolvidos como candidatos a vacinas. Estes *reassortants* induzem repostas imunes às proteínas dos capsídeos de rotavírus de humanos, enquanto mantém as propriedades de atenuação da amostra animal (Midthun e Kapikian, 1996). Várias vacinas *reassortants* foram produzidas e testadas, baseadas em amostras bovinas ou de símios (Kang 2006).

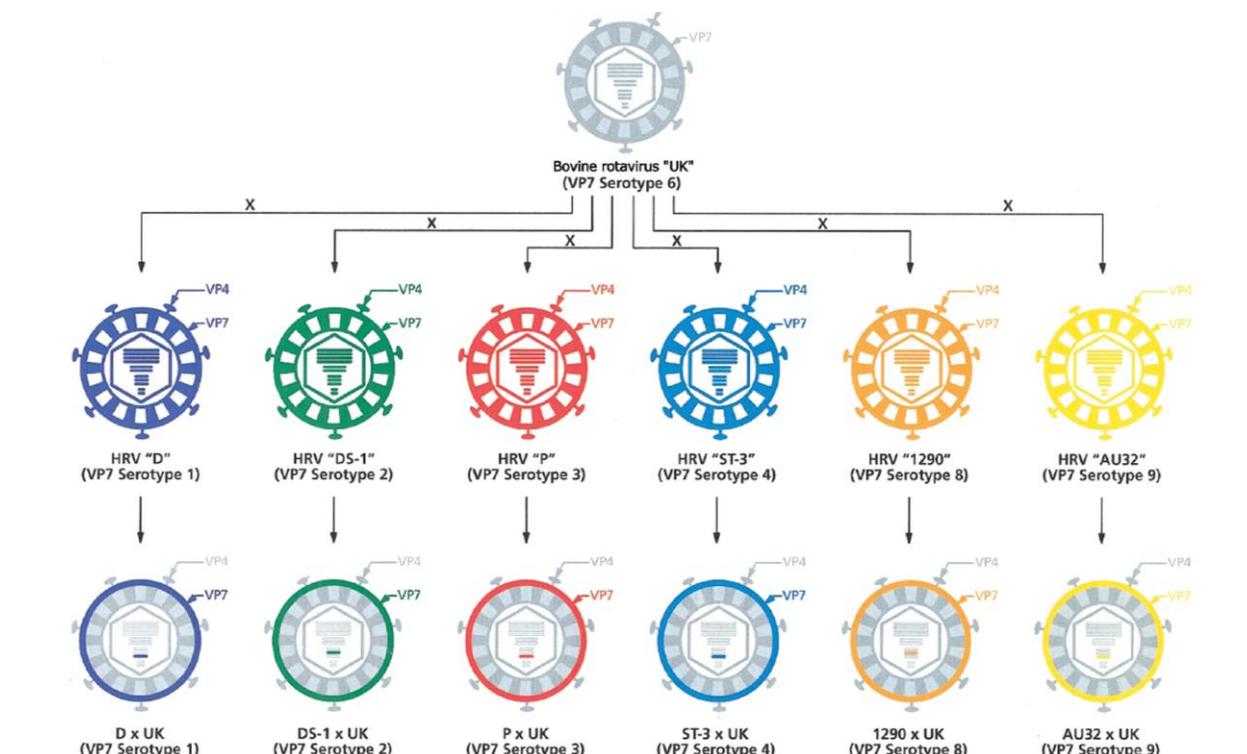
A vacina RRV-TV (Rotashield<sup>®</sup>, BioVirx, EUA) produzida primeiramente pela Wyeth-Lederle Vaccines and Pediatrics (PA, EUA) é uma vacina tetravalente produzida por meio de *reassortant* humano-rhesus que inclui a amostra RRV (G3) e 3 vírus *reassortants* que representam as amostras de G1, G2 e G4. Vários testes de eficácia foram realizados nos EUA, Finlândia e Venezuela demonstrando que a vacina apresentava 50-60% de proteção contra todas as diarreias por rotavírus e 70-100% contra a doença diarreica aguda por rotavírus. Rotashield<sup>®</sup> foi associada com febre de curta duração após a primeira vacinação, mas até o licenciamento não havia associação com outros eventos adversos. Esta foi à primeira vacina contra rotavírus no mundo, sendo licenciada nos EUA em 1998 e sua inclusão no calendário vacinal foi recomendada pela Academia Americana de Pediatria. Após a imunização de 600.000 crianças nos primeiros 9 meses do programa, essas recomendações foram suspensas após diversos relatos de casos de intussuscepção entre crianças imunizadas (CDC, 1999). Após investigações que sugeriram o aumento do risco de intussuscepção pós-vacina, o fabricante (Wyeth-Lederle Vaccines and Pediatrics, PA, EUA) retirou-a do mercado para estudos mais abrangentes. O aumento do risco de intussuscepção pareceu ser de 3 a 10 dias após a primeira dose da vacina. Embora a verdadeira incidência deste evento adverso provasse ser difícil de estimar, um grupo de renomados pesquisadores internacionais sugeriu uma taxa de 1 por 10.000 crianças vacinadas. Os mecanismos envolvendo a intussuscepção após vacinação são ainda desconhecidos (Dennehy 2008). Estudos complementares de segurança não demonstraram relação direta entre a vacina e os casos de intussuscepção (Vesikari *et al*, 2006, Hyser e Estes, 2008) e a produção da vacina foram re-estabelecida pela BioVirx, EUA.

A vacina bovino-humana, comercializada como Rotateq<sup>®</sup>, produzida pela Merck, Inc, EUA, é uma vacina baseada na amostra WC3 bovina G6P7[5], pentavalente que contém 5 *reassortants* representando os genótipos VP7 mais comuns G1-G4 e o VP4 mais comum, P[8]. Assim como a RRV, a vacina Rotateq<sup>®</sup> foi desenvolvida por meio de uma série de

amostras de *reassortants* humano-bovino que foram combinados em uma vacina polivalente. Comparado aos *reassortants* de humano-rhesus, os *reassortants* humano-bovinos parecem causar menos febre enquanto mantém a imunogenicidade. Esta vacina foi licenciada nos EUA no ano de 2006. Um grande teste de eficácia da vacina Rotateq<sup>®</sup> foi realizado nos EUA e Finlândia, demonstrando 74 e 98% de eficácia contra a doença e contra a doença aguda, respectivamente, e contra cada um dos genótipos circulantes comuns (Vesikari *et al.*, 2006). Um grande teste de segurança com mais de 70.000 crianças, no qual metade das crianças recebeu a vacina, não encontrou evidência de risco de intussuscepção entre vacinados comparando-os com crianças que receberam placebo. Durante fevereiro de 2006 e março de 2008, aproximadamente 14 milhões de doses de RV5 foram distribuídos e os resultados dos testes de monitoramento de segurança não demonstraram associação com risco de intussuscepção maior que o esperado para casos esperados (Parashar e Cortese 2009). Atualmente, a vacina Rotateq<sup>®</sup> está licenciada na Europa, EUA, África, Ásia e no Brasil.

A vacina tetravalente de *reassortant* rotavírus bovino-humano BRV (UK) desenvolvida pelo NIH (National Institute of Health, Bethesda, EUA) tem como componentes os genótipos humanos G1-G4 (amostras D, DS1, P ou ST3) em um genoma bovino UK, que se mostram seguros, imunogênicos e eficazes na prevenção da diarreia aguda grave por rotavírus. No entanto, por causa da emergência de um genótipo epidemiologicamente importante, o G9 e a importância do G8 em algumas áreas restritas, os EUA formularam uma vacina baseada nesta primeira, mas com a possibilidade de adição de outros genótipos de importância. A vacina de segunda geração formulada para países em desenvolvimento inclui não somente as amostras G1-G4, mas, também, as amostras G9 ou G8 e, deste modo compondo uma vacina hexavalente com alto grau de proteção (**Figura 3**). O efeito da adição de dois genótipos à formulação da vacina tetravalente precisa ser avaliado com cuidado, considerando-se a interferência entre as amostras, que pode

influenciar a imunogenicidade, e o aumento do custo de fabricação da vacina hexavalente (Kapikian *et al.*, 2005).



**Figura 3:** Representação esquemática de *reassortant* humano-bovino da vacina contra rotavírus hexavalente com os sorotipos 1, 2, 3, 4, 8 e 9 da VP7. Fonte: Kapikian *et al.*, 2005.

A vacina produzida pelo Instituto Butantan (IB) é baseada nesta última geração de vacina (BRV-UK), pois será composta pelos genótipos G1-G4 e G9, genótipo G9 emergente no Brasil. A vacina brasileira, portanto, será pentavalente com *reassortant* de genes de vírus bovinos e humanos. As vantagens desta mudança são as de produzir uma vacina específica para a realidade nacional.

## **1.8. LICENCIAMENTO DE VACINA**

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) para o licenciamento de uma nova vacina, alguns testes de produção, controle de qualidade e avaliação da segurança e eficácia da vacina são necessários, de acordo com normas internacionais e nacionais (ANVISA). Para a produção da vacina contra rotavírus, de *reassortant* humano-bovino atenuado, vários testes devem ser realizados em diferentes etapas da produção da vacina (**Esquema 1**) (WHO, 2005). Para isso alguns testes foram padronizados e implantados no Núcleo de Doenças Entéricas do Instituto Adolfo Lutz (IAL), em parceria com o IB no desenvolvimento e controle de qualidade da vacina pentavalente BRV-UK de rotavírus.



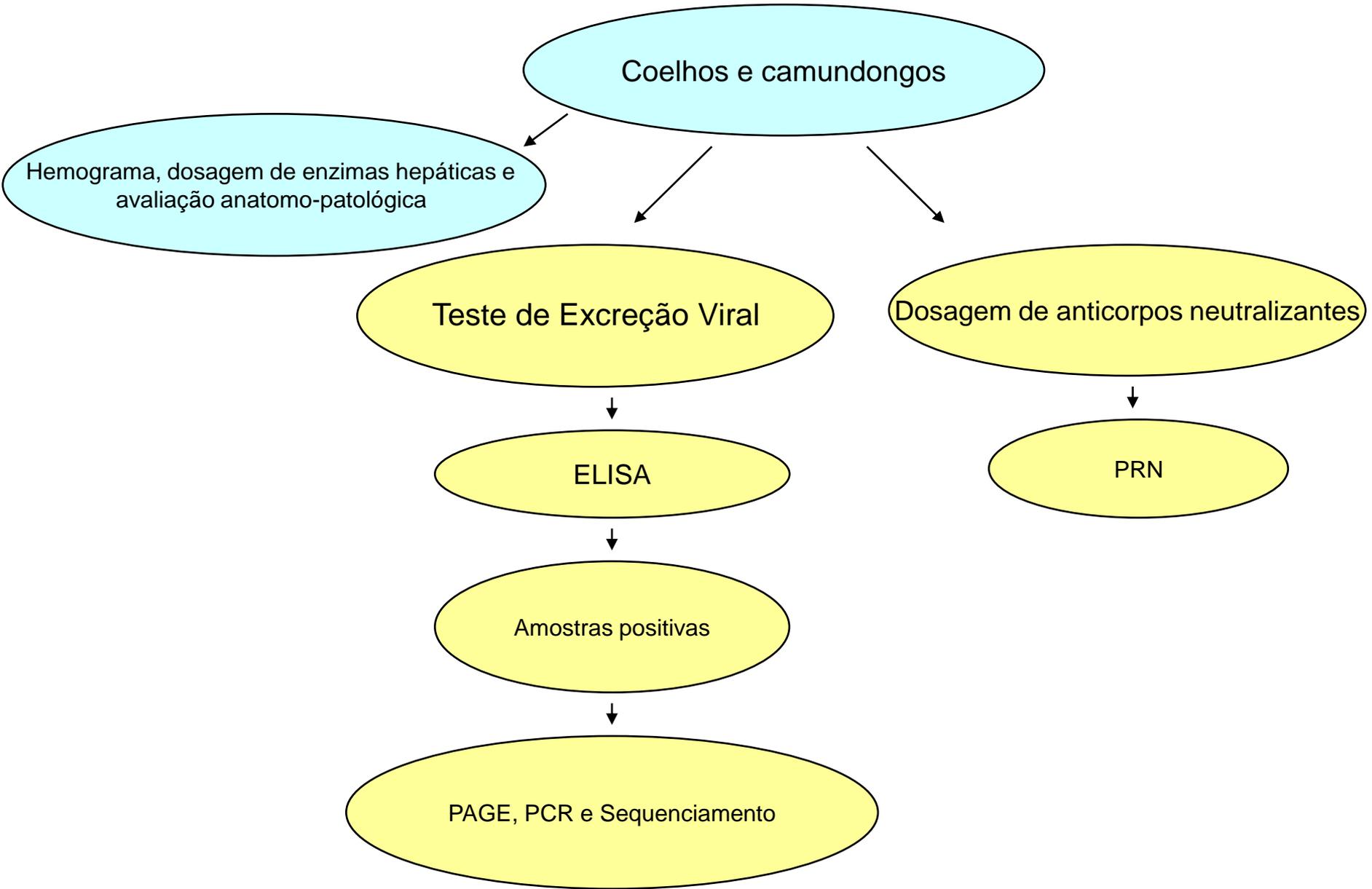
**Esquema 1:** Esquema representativo dos testes necessários para produção, controle de qualidade e avaliação da segurança e eficácia da vacina de rotavírus. Os testes executados pelo IAL apresentam-se em amarelo.

## 1.9. ENSAIOS PRÉ-CLÍNICOS

Dentre as etapas necessárias para licenciar uma vacina no Brasil, estão os ensaios pré-clínicos, que somente são realizados após aprovação da experimentação *in-vitro* da vacina estudada. Os ensaios pré-clínicos definem a segurança, toxicidade e efetividade da vacina. Estes ensaios são realizados utilizando animais de laboratório, como por exemplo: ratos, coelhos e camundongos, que se apresentem como os melhores modelos para representar a doença estudada.

Somente 2 modelos animais (coelhos e leitões gnotobióticos) apresentam infecção por rotavírus de forma semelhante à humana, permitindo o estudo da resposta imune ativa e proteção. A epidemiologia das infecções em coelhos é similar à observada em outras espécies. Ambas as infecções clínicas e subclínica ocorrem e estão associadas à alta mortalidade em populações não expostas previamente (Conner *et al.*, 1988).

Neste estudo, os ensaios pré-clínicos foram realizados no Instituto Butantan, utilizando coelhos e camundongos. Testes hematológicos, dosagem de enzimas hepáticas e avaliação anatomo-patológica foram realizados a partir de amostras dos animais estudados. O Instituto Adolfo Lutz realizou ensaios para dosagem de anticorpos neutralizantes encontrados no soro destes animais e testes para detecção de vírus nas fezes (teste de excreção viral) (**Esquema 2**).



**Esquema 2:** Esquema representativo dos testes realizados nos ensaios pré-clínicos contra a vacina rotavírus. Os testes executados pelo IAL apresentam-se em amarelo.

## *2. OBJETIVOS*

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVO GERAL**

O presente trabalho tem como objetivo principal a implantação de técnicas empregadas nos testes de potência e de identidade genética de amostras vacinais e nos testes pré-clínicos da vacina contra rotavírus produzida pelo Instituto Butantan.

### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Padronizar e implantar a técnica de plaqueamento (PFU) para titulação das amostras padrão de rotavírus e da vacina contra rotavírus;
2. Padronizar e implantar a técnica de neutralização PRN (Neutralização da Redução de Placas) para a pesquisa de anticorpos contra rotavírus nos testes pré-clínicos;
3. Implantar a técnica de RT-PCR, seqüenciamento e EGPA para testes de identidade genética das amostras vacinais;
4. Implantar as técnicas de ELISA e RT-PCR para a análise da excreção viral pós-imunização.

### *3. MATERIAIS E MÉTODOS*

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. MATERIAIS

**3.1.1. CULTURAS CELULARES:** As células de rim de macaco verde (MA104) foram fornecidas pelo IB na passagem 55 e mantidas no IAL até a passagem 80 utilizando meio Eagle 10% SFB (soro fetal bovino) para o crescimento celular. Todos os meios utilizados para a manutenção das culturas celulares e das técnicas de PFU foram fornecidos pelo IB para permitir os procedimentos de controle de qualidade.

**3.1.2. VÍRUS:** As amostras de rotavírus *reassortants*, protótipos vacinais dos genótipos G1 (UK-G1), G2 (UK-G2), G3 (UK-G3), G4 (UK-G4) e G9 (UK-G9), foram provenientes do NIH (National Institutes of Health, EUA) e as amostras do banco semente, banco primário e das vacinas monovalentes foram produzidas no Laboratório de Rotavírus do Instituto Butantan (IB). A amostra de rotavírus símio SA-11 (NIH) é mantida no Núcleo de Doenças Entéricas do IAL. A amostra de rotavírus bovino UK foi cedida pela Dra. Norma Santos (UFRJ).

**3.1.3. SOROS PADRÃO:** As amostras de soro empregadas para a padronização da técnica de neutralização foram obtidas de voluntários humanos adultos pré e pós-infecção natural por rotavírus caracterizados molecularmente como genótipos G1 e G9. Estes soros foram utilizados como soros padrão.

**3.1.4. ANIMAIS:** Coelhos da raça Nova Zelândia albino e camundongos da raça Suíça albino (machos e fêmeas) foram utilizados nos ensaios pré-clínicos da vacina contra rotavírus realizados no IB. Amostras de soros e fezes destes animais foram enviadas ao IAL para realização dos testes de excreção e dosagem de anticorpos neutralizantes. Trinta coelhos com 2 a 3 meses de idade e 30 camundongos com 6 a 8 semanas de idade, foram

divididos em 6 grupos, com 5 animais por grupo. Os animais foram inoculados com 1,0 mL de vacina ou placebo, por via oral ou intra-peritoneal, nos dias 0, 7 e 14. Os animais dos grupos 1, 2, 3 e 4 foram inoculados com a vacina e os dos grupos 5 e 6 com placebo (meio *Eagle* e sacarose). Os animais dos grupos 1 e 2 receberam 1 dose de vacina na concentração de  $2,6 \times 10^6$  PFU/mL e os dos grupos 3 e 4, três doses na concentração de  $1 \times 10^6$  PFU/mL. Os animais dos grupos 5 e 6 receberam 3 doses de placebo. As fezes dos coelhos e camundongos foram coletadas nos dias 0, 1, 2, 8, 9, 15 e 16 para avaliação da excreção viral. As amostras de soros dos coelhos foram coletadas nos dias 0, 13 e 21 para reação de neutralização de redução de placas.

**3.1.5. OLIGONUCLEOTÍDEOS:** Os oligonucleotídeos (*primers*) descritos nas **Tabelas 2 e 3** foram utilizados para a análise dos genes 9 e 4 de rotavírus referentes às proteínas VP7 (genótipo G) e VP4 (genótipo P), respectivamente.

**Tabela 2.** Oligonucleotídeos utilizados para a caracterização molecular dos rotavírus referente à proteína VP7 (genótipo G).

<i>Primer</i>	Posição	Sequência (5´- 3´)	Genótipo	Referência Bibliográfica
Beg9	1-28	GGCTTTAAAAGAGAGAATTTCCGTCTGG	*	Gouvêa <i>et al.</i> (1990)
End9	1062-1036	GGTCACATCATACAATTCTAATCTAAG	*	Gouvêa <i>et al.</i> (1990)
RVG9	1062-1044	GGTCACATCATACAATTCT	*	Gouvêa <i>et al.</i> (1990)
Anti A1	1-21	GGCTTTAAAAGAGAGAATTTCT	*	Gouvêa <i>et al.</i> (1994)
aBT1	314-335	CAAGTACTCAAATCAATGAGG	G1	Gouvêa <i>et al.</i> (1990)
aCT2	411-435	CAATGATATTAACACATTTTCTGTG	G2	Gouvêa <i>et al.</i> (1990)
aET3	689-709	CGTTTGAAGAAGTTGCAACAG	G3	Gouvêa <i>et al.</i> (1990)
aDT4	480-498	CGTTTCTGGTGAGGAGTTG	G4	Gouvêa <i>et al.</i> (1990)
aFT9	757-776	CTAGATGTAACACTACAACACTAC	G9	Gouvêa <i>et al.</i> (1990)

\*Amplifica todo o gene 9 que codifica a VP7

**Tabela 3.** Oligonucleotídeos utilizados para a caracterização molecular dos rotavírus referente à proteína VP4 (genótipo P).

<i>Primer</i>	<i>Posição</i>	<i>Sequência (5'-3')</i>	<i>Genótipo</i>	<i>Referência Bibliográfica</i>
Con3	11-32	TGGCTTCGCTACTTTATAGACA	*	Gentsch <i>et al.</i> (1992)
Con 2	868-887	ATTCGGACCACTTTATAACC	*	Gentsch <i>et al.</i> (1992)
pUK	336-354	GCCAGGTGTCGCATCAGAG	P[5]	Gouvea <i>et al.</i> (1994)
pNCDV	269-289	CGAACGCGGGGGTGGTAGTTG	P[1]	Gouvea <i>et al.</i> (1994)
pOSU	389-412	CTTTATCGGTGGAGAATACGTCAC	P[7]	Gouvea <i>et al.</i> (1994)
pGott	465-487	GCTTCAACGTCCTTTAACATCAG	P[6]	Gouvea <i>et al.</i> (1994)
pB223	574-594	GGAACGTATTCTAATCCGGTG	P[11]	Gouvea <i>et al.</i> (1994)

\*Amplificação parcial do gene 4 que codifica a VP4

## 3.2. MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO DA VACINA CONTRA ROTAVÍRUS

### 3.2.1. MANUTENÇÃO DE CULTURAS CELULARES

As células da linhagem MA104 (rim de macaco verde) fornecidas pelo IB foram mantidas em estufa a 37°C até o momento do subcultivo, que foi realizado de acordo com a necessidade dos testes, utilizando metodologia descrita por Wyatt *et al* (1983).

Para o subcultivo, o meio de crescimento foi retirado e a cultura celular lavada duas vezes com meio L15 puro (IB) e mais duas vezes com solução de tripsina-EDTA (IB). A cultura foi incubada em estufa a 37°C por 5 a 10 minutos e ressuspensa em 10 mL de meio Eagle contendo 10% de soro fetal bovino (IB) e gamicina ([ ] 50 µg/mL). Procedeu-se, então, à contagem de células utilizando-se a câmara de Neubauer e a preparação da suspensão celular contendo 350.000 cels/mL que foi distribuído nas placas de 6 cavidades (Corning®, NY, EUA, código 3506) tratadas para cultura celular. As placas foram incubadas em estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C até a formação da monocamada celular para serem utilizadas nos testes.

### **3.2.2. TÉCNICA DE TITULAÇÃO VIRAL**

As amostras dos cinco genótipos de rotavírus utilizados na vacina foram examinadas quanto à potência pela técnica de plaqueamento PFU (Unidade Formadora de Placa).

A técnica de PFU é baseada na habilidade de uma única partícula viral infectar e aumentar a área macroscópica do efeito citopático em culturas celulares de monocamadas. Especificamente, se uma única célula é infectada com uma partícula viral, após alguns dias, novos vírus resultantes da infecção inicial podem infectar as células ao redor desta, formando o que denominamos de “placa”. No caso do teste de plaqueamento, este efeito é alcançado com a utilização de meio sólido para manutenção das células pós-infecção. A contagem destes focos é um método quantitativo que demonstra a infectividade viral (Schmidt NJ, 1989).

#### **3.2.2.1. PADRONIZAÇÃO DA TITULAÇÃO DE VÍRUS POR UNIDADE FORMADORA DE PLACA (PFU)**

Para a padronização da metodologia de plaqueamento foi utilizada a técnica descrita por Hoshino *et al* (1984), com modificações (Timenetsky *et al.*, 1997).

As culturas de células de rim de macaco verde (MA104) (passagem 55 a 82) foram subcultivadas em placas de cultura celular de 6 cavidades (Corning<sup>®</sup>, NY, EUA, código 3506) utilizando-se diluições diversas (200.000, 250.000, 300.000 e 350.000 células/mL) e observadas até a formação da monocamada (80 a 90% de confluência celular). Os rotavírus *reassortants* G1 (UK-G1), G2 (UK-G2), G3 (UK-G3), G4 (UK-G4) e G9 (UK-G9) (padrões fornecidos pelo NIH) foram ativados (v/v) com uma solução de meio L15 puro e tripsina tipo IX (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, EUA) [ ] 5 µg/mL, incubando-se em banho-maria a 37°C por 30 minutos. Os vírus foram, então, diluídos seriadamente em log<sub>10</sub> (10<sup>-2</sup> a 10<sup>-7</sup>) a partir da diluição inicial ativada. Após duas lavagens das culturas celulares com 2 mL/cavidade de meio L15 puro,

as diluições (em duplicatas) das amostras virais foram adicionadas (500 µL) em cada cavidade da placa e incubadas em estufa por 1h a 37°C. Após a adsorção viral, as células foram novamente lavadas com meio L15 puro e foram adicionados 3mL de meio semi-sólido (*overlay*) (100 mL EMEM 2X/garamicina [ ] 50 µg/mL, 100mL agarose Seakem<sup>®</sup> ME 1,2% (Cambrex Bio Science Rockland, Inc, EUA) e 50 µL tripsina tipo IX [ ] 0,5 µg/mL). Para a formação das placas de lise foi necessário o ajuste do pH deste meio para 7,0 utilizando-se solução de bicarbonato de sódio ou ácido clorídrico a 10% (de acordo com a variação do pH). Após a solidificação, as placas foram invertidas e incubadas em estufa com 5% de CO<sub>2</sub>.

Após 4 dias de incubação, 2 mL do segundo meio semi-sólido (*overlay*) (100 mL EMEM 2X/garamicina [ ] 50 µg/mL, 100 mL agarose Seakem<sup>®</sup> ME 1,2% e 3mL vermelho neutro 0,1% (Sigma<sup>®</sup>, EUA) foram adicionados em todas as cavidades das placas. Após a solidificação, as placas foram invertidas, protegidas contra a luz e incubadas em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Leituras em transiluminador de luz branca foram realizadas em 24 e 48h para contagem das placas formadas.

O teste de PFU foi implantado para a titulação das amostras dos rotavírus padrão, das amostras de rotavírus vacinais (*reassortants* dos cinco genótipos), as amostras do banco semente, banco primário e da vacina.

### **3.2.2.2. CÁLCULO DO PFU**

Para o cálculo do PFU foi considerado o número de placas das cavidades que continham de 8 a 80 placas. A média da contagem das cavidades de mesma diluição em duplicata foi multiplicada pelo fator de diluição 10 (10<sup>-n</sup>) e dividida pelo valor do inóculo (0,5 mL).

A relação entre PFU e o número de partículas infecciosas é dependente da eficiência do plaqueamento e pode ser tão baixo como 1 em 100 em alguns sistemas (Hoshino *et al.*, 1984).

### **3.2.3. TÉCNICAS MOLECULARES**

As metodologias moleculares descritas foram empregadas para testes de identidade genética das amostras vacinais obtidas nas diferentes etapas da produção da vacina.

Para a implantação dos testes de identidade genética das amostras virais utilizadas nas diferentes fases da produção da vacina BRV-UK/RH do Instituto Butantan foram utilizados testes implantados previamente no Núcleo de Doenças Entéricas do IAL e validados pelo NIH (Santos *et al*, 2008). Os protocolos foram padronizados utilizando-se amostras padrão recebidas do NIH que foram usados como controles nos testes de identidade genética das alíquotas dos vírus obtidos nas diferentes etapas de produção da vacina.

#### **3.2.3.1. EXTRAÇÃO DE RNA**

A extração de RNA<sup>df</sup> foi realizada utilizando o kit *QIAamp<sup>®</sup> Viral RNA Mini Kit* (Qiagen, Inc., Valencia, CA). Neste kit utilizam-se colunas de centrifugação composta por sílica-gel para aumentar as chances de extração e concentração de pequenas quantidades de ácido nucléico. Esta metodologia foi utilizada para extração do RNA<sup>df</sup> das amostras vacinais, segundo as instruções do fabricante.

As amostras vacinais foram mantidas em freezer -70°C até o momento da extração, em que 140 µL das amostras foram adicionadas a 560 µL do tampão AVL contendo o *RNA Carrier* e estes microtubos, agitados vigorosamente. As amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugadas rapidamente. Em seguida, 560 µL de etanol 100% foram adicionados e novamente, as amostras foram agitadas vigorosamente e centrifugadas. À coluna de sílica foram adicionados 630 µL da mistura e esta, centrifugada a 8000 rpm por 1 minuto para ligação do RNA ao filtro. O coletor contendo o filtrado foi descartado e substituído por outro. Este procedimento foi repetido mais uma vez ou até que toda a

mistura tenha atravessado a coluna. Foram adicionados 500 µL do tampão AW1 na coluna para lavagem do RNA e esta foi centrifugada a 8000 rpm por 1 minuto. O tubo coletor foi descartado e substituído; 500 µL do tampão AW2 foram adicionados à coluna e centrifugados a 14000 rpm por 3 minutos. O coletor contendo o filtrado foi descartado, substituído e nova centrifugação foi realizada a 14000 rpm por 1 minuto. Finalmente, foram adicionados 60 µL de tampão AVE à coluna, incubada 1 minuto à temperatura ambiente e centrifugada a 8000 rpm por 1 minuto. O filtrado contendo o RNAdf foi armazenado em freezer -20°C até o momento do uso.

### **3.2.3.2. TRANSCRIÇÃO REVERSA - REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (RT-PCR)**

Para a caracterização molecular das amostras de vírus padrão vacinais foi realizada reação de RT-PCR em etapa única, com a transcrição reversa do RNAdf seguida da amplificação de acordo com metodologias descritas por Gouvea *et al.* (1990) e Gentsch *et al.* (1992).

Na detecção de rotavírus toda a extensão do gene 9 foi amplificada com o *pool de primer* Beg9-End9 (Gouvea *et al.*, 1990). Para o genótipo G2 também foi utilizado o *primer* Anti-A1/RVG9 para a tentativa de amplificação do gene 9 de todas as amostras. Para o gene 4 foi utilizado o *pool de primer* Con2-Con3 para amplificação da região com 887 pb que abrange as subunidades VP5\* e VP8\* do gene 4 (Gentsch *et al.*, 1992).

Para a desnaturação do RNAdf foram distribuídos 10 µL de cada amostra em microtubos contendo 3 µL de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma). Para o genótipo G2 também foram testadas quantidades de 3 e 5 µL de RNAdf. Em seguida, os microtubos foram colocados em termobloco e a desnaturação da dupla fita de RNA foi realizada através de aquecimento a 93°C por 3 minutos. Rapidamente, as amostras foram transferidas para um recipiente contendo gelo por 5 minutos. Também foram utilizadas amostras de água para controle negativo.

A mistura da RT-PCR *one step in house* foi composta de 1,25 mM de cada deoxinucleotídeo (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) (*Invitrogen*<sup>TM</sup>), 0,5X de tampão 10X concentrado (*Invitrogen*<sup>TM</sup>, CA, EUA), 1,25 mM solução de cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>) (*Invitrogen*<sup>TM</sup>), 20 µM do *pool* de *primer* Beg9-End9 ou Con2-Con3 (*Invitrogen*<sup>TM</sup>), 2,5 U *Super Script*<sup>®</sup> II *Reverse Transcriptase* (*Invitrogen*<sup>TM</sup>), 1 U *Platinum Taq DNA Polimerase* (*Invitrogen*<sup>TM</sup>) e água MilliQ para volume final de 50 µL. A reação foi realizada em banho de gelo e 37 µL da mistura foram adicionados ao microtubos contendo os RNAdf desnaturados.

Os microtubos foram colocados no termociclador (Gene Amp PCR System 9600, Perkin Elmer Cetus) que foi programado para incubação inicial de 42°C por 60 minutos. Após a RT, seguiu-se a amplificação em 30 ciclos de (94°C por 1 minuto, 42°C por 2 minutos, 72°C por 1 minuto) e extensão final a 72°C por 5 minutos. Os produtos amplificados foram observados em gel de agarose a 1,2% em tampão TBE 1X (Tris-Ácido Bórico-EDTA), corado com 0,5 µg de brometo de etídeo (Sambrook *et al.*, 1989).

Os produtos da amplificação e o marcador de peso molecular (100 pb DNA *Ladder-Invitrogen*<sup>TM</sup>) acrescidos de tampão de corrida (azul de bromofenol 1% diluído em sacarose) foram aplicados em gel de agarose 1,5% e submetidos a uma corrente elétrica constante de 150V por 50 minutos. Após eletroforese, os produtos obtidos foram observados em transiluminador de luz ultravioleta (UV) e a imagem gerada foi captada pelo sistema de fotodocumentação (*UV Transilluminator*, UVP Laboratory Products).

### **3.2.3.3. GENOTIPAGEM**

A genotipagem dos produtos da RT-PCR foi realizada pelo método de multiplex semi-nested PCR para os genes 4 e 9, empregando-se o *pool* de *primers* para VP7 que contém *primers* para amplificação dos genótipos G1-4

e G9 e o *pool* de *primers* para VP4 que contém *primers* para amplificação dos genótipos UK, NCDV, OSU, Gottfried, B223 (Gouvea *et al.*, 1990, 1994).

Em microtubos foi realizada a mistura para a PCR contendo: 1,25 mM de cada deoxinucleotídeo (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) (*Invitrogen*<sup>TM</sup>, EUA), 0,5X de tampão 10X concentrado (*Invitrogen*<sup>TM</sup>, EUA), 1,25 mM solução de cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>) (*Invitrogen*<sup>TM</sup>), 20 µM do *pool* de *primer* VP7 ou VP4 (*Invitrogen*<sup>TM</sup>), 1 U *Platinum Taq DNA Polimerase* (*Invitrogen*<sup>TM</sup>) e água MilliQ para volume final de 25 µL. A reação foi realizada em banho de gelo e 24 µL da mistura foram adicionados aos microtubos contendo 1µL do produto da RT-PCR.

Os microtubos foram colocados no termociclador (Gene Amp PCR System 9600, Perkin Elmer Cetus) que foi programado para amplificação em 25 ciclos de (94°C por 1 minuto, 55°C por 2 minutos, 72°C por 1 minuto) e extensão final a 72°C por 5 minutos. Os produtos amplificados foram observados em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo e documentados como descrito anteriormente (Sambrook *et al.*, 1989).

#### **3.2.3.4. SEQUENCIAMENTO GENÉTICO**

Os produtos da PCR foram purificados utilizando o *Concert*<sup>TM</sup> *Rapid PCR Purification System* Germany, US, UK. (GIBCO BRL<sup>®</sup>) de acordo com o fabricante.

O sequenciamento das amostras foi realizado utilizando o kit *Big Dye*<sup>TM</sup> *Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* (Applied Biosystems, Inc., EUA) utilizando os *primers* descritos nas tabelas 2 e 3, segundo método de Sanger *et al* (1977). Os produtos do sequenciamento foram purificados utilizando colunas de centrifugação (Centri-Sep Columns) (Adelphia, Ni.) (Sambrook *et al.*, 1989) e submetidas à análise em seqüenciador automático ABI 377 (Applied Biosystems, Inc. USA). Os programas BioEdit, Clustal e DNASTar foram empregados para a análise das seqüências obtidas.

### **3.2.3.5. ANÁLISE DE SEQÜÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS**

As seqüências obtidas foram editadas pelo programa *Chromas*. As seqüências das amostras vacinais foram comparadas com as seqüências dos vírus padrão (NIH) G1, G2, G3, G4 e G9 e, com seqüências obtidas no GenBank: rotavírus NCDV (Nº acesso M63267) e rotavírus UK (Nº acesso M22306).

A análise molecular foi realizada comparando as seqüências de nucleotídeos das amostras vacinais padrão utilizando o programa de alinhamento múltiplo *Clustal X*, desenvolvido por Thompson *et al* (1997). Os programas *Bioedit* e *Megalign* (*DNAstar*, Inc. Madison, Wis. USA) foram usados para a tradução automática das seqüências de nucleotídeos e para o cálculo do grau de identidade entre as seqüências analisadas.

### **3.2.4. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (EGPA)**

Para a eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) foram extraídos os RNAdf das amostras vacinais e de amostras utilizadas como controle positivo para rotavírus: SA11 (símio) e UK (bovino). Esta técnica foi adaptada de Pereira *et al* (1983).

Para 600 µL das culturas celulares infectadas foram adicionados 300µL da mistura fenol-clorofórmio, 50 µL de EDTA 0,5M e 50 uL de SDS 10%. Após agitação, a mistura foi centrifugada a 5000 x g por 2 minutos. À fase aquosa coletada foram adicionados 1,0 mL de etanol 100% (conservado em -20oC) e 50 µL de NaCl (5M). A mistura foi homogeneizada levemente e incubada a -20°C *overnight*. Após centrifugação a 5000 x g por 15 minutos a 4°C, o álcool foi decantado e o sedimento seco à temperatura ambiente. O sedimento foi suspenso em 50 µL de água MilliQ estéril e armazenado em freezer -20° C. Para a dissociação do RNA, 15 µL de cada amostra e dos padrões foram misturados a 5 µL de tampão da amostra (uréa 5M, 2-mercaptoetanol 5%, SDS 10%, Tris-HCl 0,5M, azul de bromofenol 1%)

e incubado a 56° C por 15 minutos. As amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida na concentração de 7% pH 8,8 na fase separadora e 3,5% pH 6,8 na fase concentradora. A eletroforese dos segmentos dos RNAdf foi realizada no sistema de tampão Tris-glicina pH 8,3 aplicando-se corrente constante de 40mA, durante 1h. Os géis foram corados em solução de nitrato de prata 0,11M e revelados em solução de NaOH 0,75M adicionada de formalina 0,95%. Os géis secos foram analisados quanto aos perfis eletroforéticos encontrados.

### **3.3. MÉTODOS UTILIZADOS NOS ENSAIOS PRÉ-CLÍNICOS**

#### **3.3.1. TÉCNICAS DE NEUTRALIZAÇÃO**

As amostras de soro dos coelhos utilizados nos testes pré-clínicos foram analisadas utilizando-se técnicas de neutralização. Na técnica de Soroneutralização por Redução de Placa (PRN) analisamos a neutralização dos anticorpos presentes nos soros de animais em relação aos diferentes genótipos de rotavírus utilizados na vacina, comparando-se as amostras pré e pós-vacinação.

O teste de PRN é uma metodologia muito sensível de detecção de anticorpos neutralizantes que permite a interação vírus-anticorpo e a medida do efeito dos anticorpos na infectividade viral por plaqueamento em células. As placas formadas são contadas e comparadas à concentração inicial do vírus para determinar o percentual de redução da infectividade viral (Schmidt NJ, 1989).

### **3.3.1.1. PADRONIZAÇÃO DA SORONEUTRALIZAÇÃO POR REDUÇÃO DE PLACA (PRN)**

A técnica de PRN foi adaptada de Wyatt *et al* (1982). Os rotavírus *reassortants* G1 (UK-G1), G2 (UK-G2), G3 (UK-G3), G4 (UK-G4) e G9 (UK-G9) titulados por plaqueamento foram utilizados como antígenos padrão e os soros de voluntários pré e pós-infecção natural por rotavírus genótipos G1 e G9, utilizados como soros padrão.

Para a padronização da reação de neutralização os vírus foram ativados (v/v) com meio L15 e tripsina tipo IX [ ] 5 µg/mL por 30 minutos a 37° C em banho-maria. Os soros de voluntários pré e pós-infecção natural por rotavírus foram inativados a 56°C por 30 minutos em banho-maria. Após este período, os soros foram diluídos utilizando-se diluição inicial de 1:40, continuando com diluições de 4x. . Igual volume dos antígenos (G1-4 ou G9) ativados com solução de meio L15 puro e tripsina tipo IX (Sigma-Aldrich®, EUA) [ ] 5 µg/mL, e diluídos a 50 PFU/mL foram adicionados aos soros diluídos, incubando-se em estufa 37°C por 1h. As placas de 6 cavidades contendo cultura de célula MA104 confluyente foram lavadas 2 vezes com 2 mL/cavidade de meio L15 e, as misturas soro-vírus foram adicionadas às cavidades (em duplicata), incubando-se em estufa 37°C por 1h. Então, as culturas foram novamente lavadas e, adicionados 3 mL de meio semi-sólido (*overlay*) (100 mL EMEM 2X/ gamicina [ ] 50 µg/mL, 100 mL agarose Seakem® ME 1,2% e 50 µL tripsina tipo IX [ ] 0,5 µg/mL). Após a solidificação, as placas foram invertidas e incubadas em estufa com 5% de CO<sub>2</sub>.

Após 4 dias de incubação, 2 mL do segundo meio semi-sólido (*overlay*) (100 mL EMEM 2X/ gamicina [ ] 50 µg/mL, 100 mL agarose Seakem® ME 1,2% e 3 mL vermelho neutro 0,1% (Sigma®, EUA) foram adicionados em todas as cavidades das placas. Após a solidificação, as placas foram invertidas, protegidas contra a luz e incubadas em estufa com 5% de CO<sub>2</sub>. Leituras foram realizadas em 24 e 48h para contagem das placas formadas (Hoshino *et al.*, 1984).

O teste PRN foi implantado para a pesquisa de anticorpos em soros pré e pós-vacinação dos coelhos utilizados nos testes pré-clínicos.

### **3.3.1.2. CÁLCULO DE PRN**

O cálculo do PRN foi realizado obtendo-se o número médio de placas dado pela razão entre a soma do número de placas contadas e o número de cavidades observadas. A partir daí, calculou-se o título neutralizante de redução do número de placas a 60% (Wyatt *et al*, 1982).

### **3.3.2. TÉCNICAS MOLECULARES**

#### **3.3.2.1. EXTRAÇÃO DE RNAdf COM TRIZOL<sup>®</sup>**

Os RNAdf foram extraídos das fezes dos animais (testes pré-clínicos) contendo os genótipos de rotavírus utilizando o reagente *Trizol<sup>®</sup>* (Invitrogen, EUA), que libera o RNAdf pelo rompimento da cápside da partícula viral, de acordo com instruções do fabricante (Chomczynski e Sachi 1987).

Em um microtubo de 1,5 mL, suspensão a 10% de fezes em *Trizol<sup>®</sup>* foi incubada por 5 minutos à temperatura ambiente (15°C a 30°C); em seguida foram adicionados 200 µL de clorofórmio, para separação da fase aquosa que contém o RNAdf viral e após 3 minutos, os microtubos foram centrifugados por 15 minutos a 12000 x g. Ao sobrenadante foi adicionado 500 µL de álcool isopropílico (isopropanol) para precipitação do RNAdf. Após 10 minutos à temperatura ambiente, os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 12000 x g; o sobrenadante foi removido e descartado. Em seguida, o sedimento foi lavado com 1000 µL de etanol a 75% (preparado na hora do uso) e centrifugado por 5 minutos a 12000 x g. O sedimento (RNAdf extraído) foi seco pela inversão do microtubo em papel absorvente por 10 minutos. Em seguida, o RNAdf foi ressuspensão em 40 µL de água MilliQ

estéril, incubado por 10 minutos a 55°C (em bloco térmico) e estocado em freezer -20°C.

As técnicas de RT-PCR, genotipagem, sequenciamento e análise de seqüências e de EGPA utilizadas para análise da excreção viral das amostras de animais foram realizadas de acordo com os protocolos descritos acima.

### **3.2.6. ELISA**

Para o ensaio de ELISA, as amostras de fezes dos coelhos e dos camundongos foram clarificadas pela suspensão das fezes em tampão Tris-HCL 0,1 M pH 7,4 e centrifugadas a 5000 xg por 30 minutos (Pereira *et al.*, 1983). As suspensões virais dos coelhos e ratos utilizados nos testes pré-clínicos foram analisadas quanto à presença de antígenos virais.

O kit *RIDASCREEN*<sup>®</sup> rotavírus (R-Biopharm AG, Darmstadt, Alemanha) foi utilizado para o ensaio das amostras.

Na microplaca que é sensibilizada com anticorpos monoclonais contra a proteína do capsídeo do gene 6 (VP6) foram distribuídos 100 µL da suspensão da amostra de fezes clarificadas e 100 µL dos controles positivo e negativo. Então, foram adicionados a todas as cavidades 100 µL de anticorpos monoclonais contra rotavírus monoclonais conjugado com peroxidase e a microplaca incubada à temperatura ambiente (20 a 25°C) por 60 minutos. Após lavagens automatizadas (Wellwash 4 MK2, Thermo Scientific) (5 vezes cada cavidade com 300 µL de tampão de lavagem), foram adicionados 100 µL do substrato (OPD) e as placas foram incubadas à temperatura ambiente por 15 minutos, observando-se formação de coloração azul da amostra controle positiva. Por meio da adição de 50 µL do reagente bloqueador, ocorreu mudança da coloração azul para amarela. Na presença de rotavírus houve formação de um complexo tipo sanduíche dos anticorpos imobilizados, antígenos de rotavírus e anticorpos conjugados. Os anticorpos marcados com enzimas não ligadas foram retirados com a

lavagem. A leitura da absorbância (450 nm) proporcional à concentração de rotavírus presente na amostra foi realizada em espectrofotômetro de placa (Multiskan FC, Thermo Scientific).

Para o cálculo do valor do *cut off*, 0,15 foi acrescentado ao valor de absorbância do controle negativo. Amostras com o valor de absorbância acima de 10% do valor do *cut off* foram consideradas positivas e amostras que ficaram abaixo de 10%, negativas. Amostras que tiveram valor de absorbância dentro deste intervalo de 10% do *cut off* foram repetidas com novo inóculo.

## *4. RESULTADOS*

## 4. RESULTADOS

A implantação dos testes de potência e identidade viral utilizada no desenvolvimento e controle de qualidade da vacina contra rotavirus produzida pelo Instituto Butantan (IB) possibilitou a análise das amostras de rotavírus vacinais padrão e as amostras do banco semente, banco primário e da vacina.

As amostras de fezes e de soro dos animais empregados em testes pré-clínicos foram analisadas quanto à excreção viral (coelhos e camundongos) e à presença de anticorpos neutralizantes contra rotavirus pós-vacinação (coelhos). Esses testes serão utilizados nos ensaios clínicos de fase I da vacina produzida pelo IB.

### **4.1. RESULTADOS DAS ANÁLISES DA VACINA CONTRA ROTAVÍRUS**

#### **4.1.1. PADRONIZAÇÃO DE TÉCNICAS DE PLAQUEAMENTO**

A padronização do **teste de plaqueamento** (PFU) foi realizada a partir da técnica de Hoshino *et al.* (1984) com algumas modificações.

Inicialmente estabeleceram-se diferentes concentrações de células (200.000, 250.000, 300.000, 350.000 e 400.000 células/mL) da linhagem MA104, subcultivadas em placas de 6 cavidades para se observar o tempo necessário para a confluência da monocamada celular. A concentração ideal determinada foi de 350.000 células/mL e 3 dias para formação da monocamada.

Para o preparo do meio semi-sólido (overlay) utilizado nas reações de Plaqueamento foram testados diferentes pHs e, frente a variações observadas para o plaqueamento, o pH do meio foi ajustado para pH 7,0, sempre que houve necessidade, fator crucial para a formação de placas. O

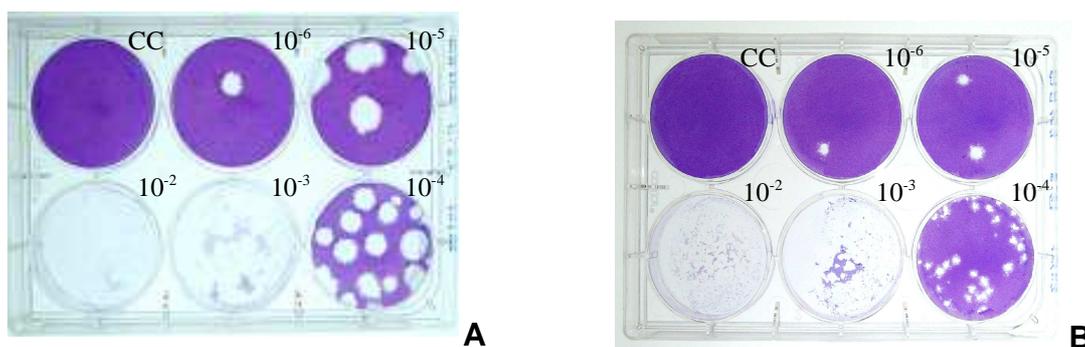
ajuste do pH foi realizado utilizando-se solução de bicarbonato de sódio a 10% ou solução de ácido clorídrico (HCl) a 10%.

Também foi observado que para a eficiência do plaqueamento as culturas celulares não devem ultrapassar a passagem 76.

Para se obter os títulos dos vírus padrão fornecidos pelo NIH foram realizadas três titulações independentes, em duplicata, para todos os vírus e calculadas as médias dos resultados, determinando assim o título de cada vírus para utilização nos testes de neutralização.

#### 4.1.2. IMPLANTAÇÃO DOS TESTES DE POTÊNCIA NAS AMOSTRAS VACINAIS

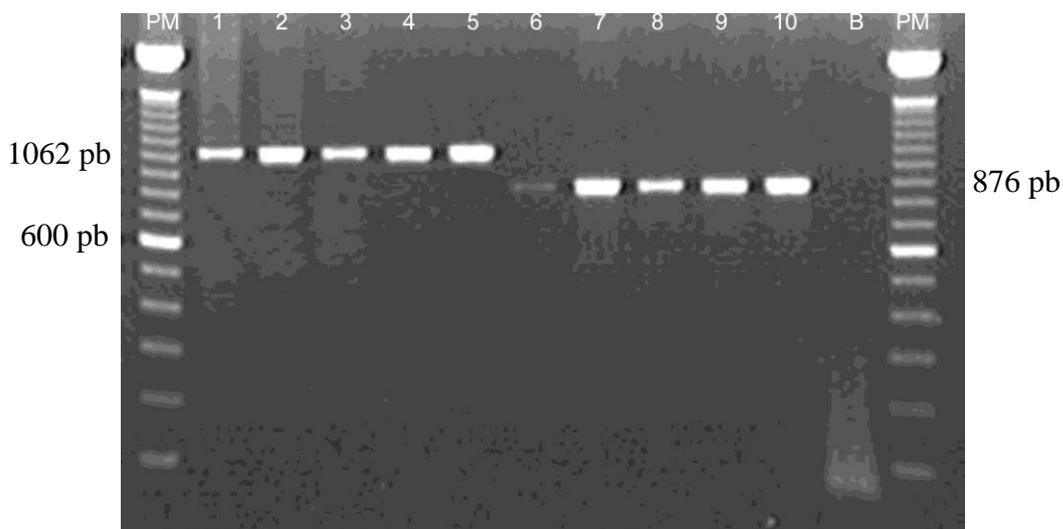
Após a padronização do teste de plaqueamento para titulação dos rotavírus das amostras vacinais dos cinco genótipos estudados, as amostras do banco semente, banco primário e das vacinas monovalentes foram tituladas: 35 amostras UK-G1, 55 amostras UK-G2, 38 amostras UK-G3, 36 amostras UK-G4 e 36 amostras UK-G9, obtendo-se títulos que variaram de  $10^5$  a  $10^7$ . Exemplo da titulação das amostras virais, determinado em PFU/mL está representado na **Figura 4**.



**Figura 4.** Método de plaqueamento em cultura celular (PFU/mL). (A) rotavírus genótipo G9 e (B) rotavírus genótipo G1. As imagens foram obtidas após coloração com cristal de violeta.

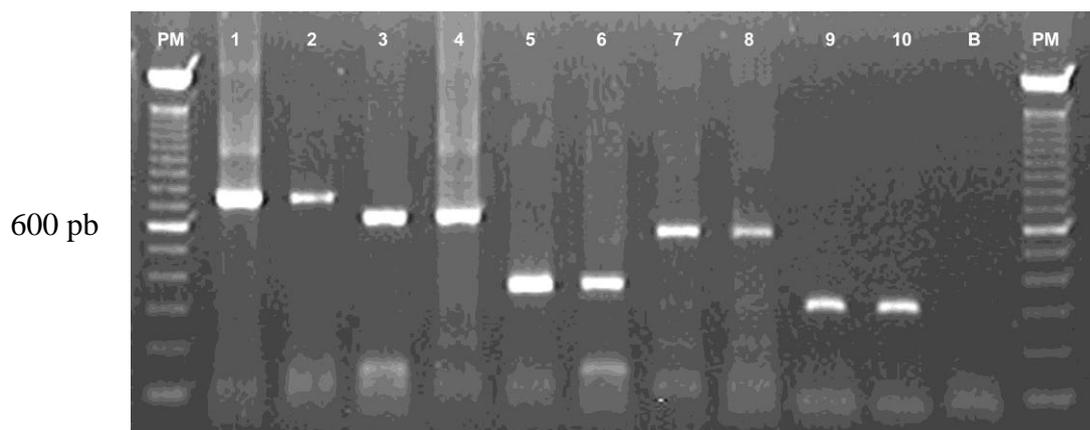
#### 4.1.3. TÉCNICAS MOLECULARES PARA TESTES DE IDENTIDADE GENÉTICA

As amostras analisadas quanto à identidade genética para rotavírus, foram genotipadas pela técnica de RT-PCR, utilizando os *pools* de *primers* apresentados nas Tabelas 2 e 3. Exemplos dos produtos de DNA obtidos pela amplificação do gene 9 (1062 pb) e do gene 4 (876 pb) podem ser visualizados na **Figura 5**.

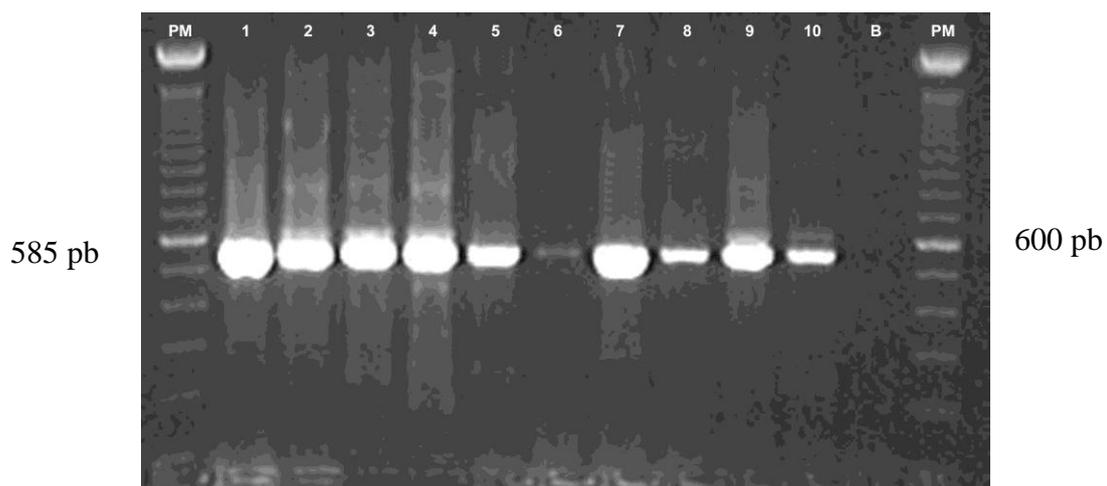


**Figura 5.** Amostras representativas dos produtos da amplificação de rotavírus vacinais padrão e banco semente, banco primário e protótipos vacinais, observados em gel de agarose: canaletas 1 a 5 - produtos do gene 9; canaletas 6 a 10 - produtos do gene 4; PM - 100 pb – DNA Ladder; B - branco (controle de contaminação).

Exemplos de produtos de DNA obtidos pela amplificação dos genótipos G1 (749 pb), G2 (652 pb), G3 (374 pb), G4 (583 pb), G9 (306 pb) podem ser visualizados na **Figura 6** e dos genótipos P[5] (UK) (585 pb) na **Figura 7**.



**Figura 6:** Amostras representativas dos genótipos G identificados nas amostras vacinais: canaletas 1-2 (G1); canaletas 3-4 (G2); canaletas 5-6 (G3); canaletas 7-8 (G4); canaletas 9-10 (G9), produtos de PCR observados em gel de agarose; PM - 100 pb – DNA Ladder, B, branco (controle de contaminação).

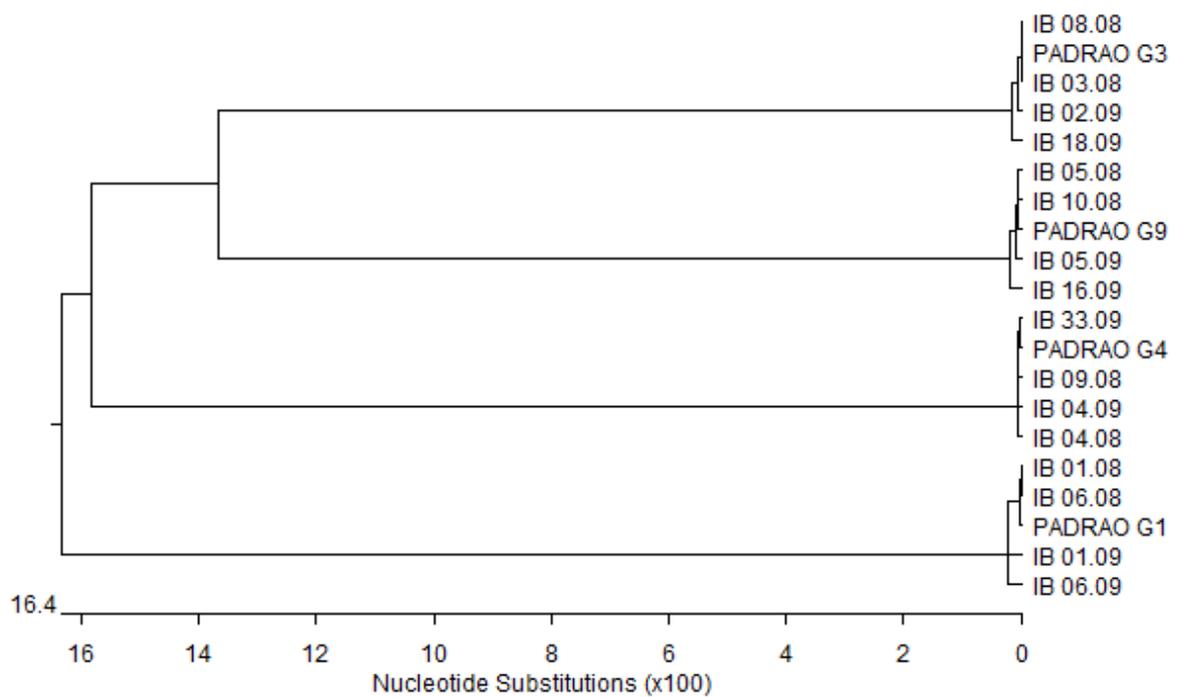


**Figura 7:** Amostras representativas do genótipo P[5] (UK) identificado nas amostras vacinais: canaletas 1 a 10, produtos de PCR (585 pb) observados em gel de agarose; PM - 100 pb – DNA Ladder, B, branco (controle de contaminação).

#### 4.1.4. SEQUENCIAMENTO GENÔMICO DAS AMOSTRAS VACINAIS

O gene 9 de todas as amostras vacinais foi analisado por sequenciamento. As seqüências de nucleotídeos obtidas foram alinhadas e comparadas com os respectivos padrões. As seqüências das amostras genótipos G1, G3, G4 e G9 apresentaram 99,3% a 100% de identidade quando comparadas as seqüências padrão. Exemplos dos resultados obtidos estão demonstrados na **Tabela 4** e na **Figura 8**. As seqüências de aminoácidos deduzidos destas mesmas amostras foram analisadas obtendo-se 100% de identidade (**Tabela 4a**).





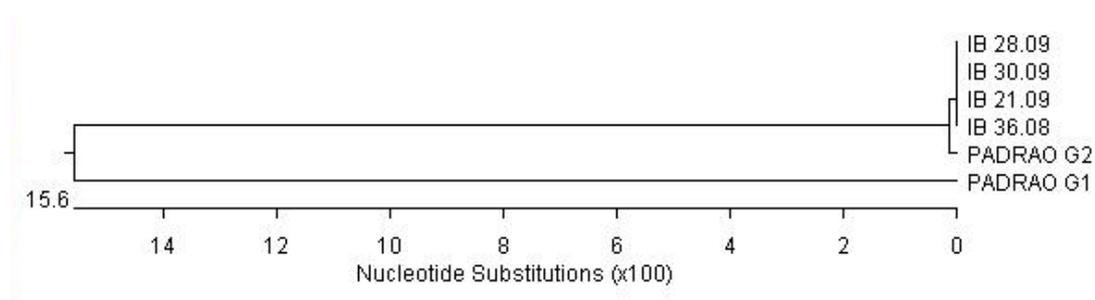
**Figura 8:** Dendrograma indicando identidade das seqüências de nucleotídeos de amostras representativas dos genótipos G1, G3, G4 e G9 da vacina contra rotavírus comparadas às seqüências dos respectivos padrões. A escala indica o número de resíduos de nucleotídeos divergentes.



O sequenciamento das amostras G2 foi realizado a partir do produto obtido com o *pool* de *primers* aCT2 – anti A1. As seqüências das amostras genótipos G2 apresentaram 100% de identidade quando comparadas às seqüências das amostras padrão respectivas. O sequenciamento do gene 4, genótipo P[5] (UK) das amostras vacinais, realizado a partir do produto obtido do *primer* específico, apresentou 100% de identidade. Exemplos dos resultados obtidos estão demonstrados nas **Tabelas 5 e 6** e nas **Figuras 9 e 10**, respectivamente.

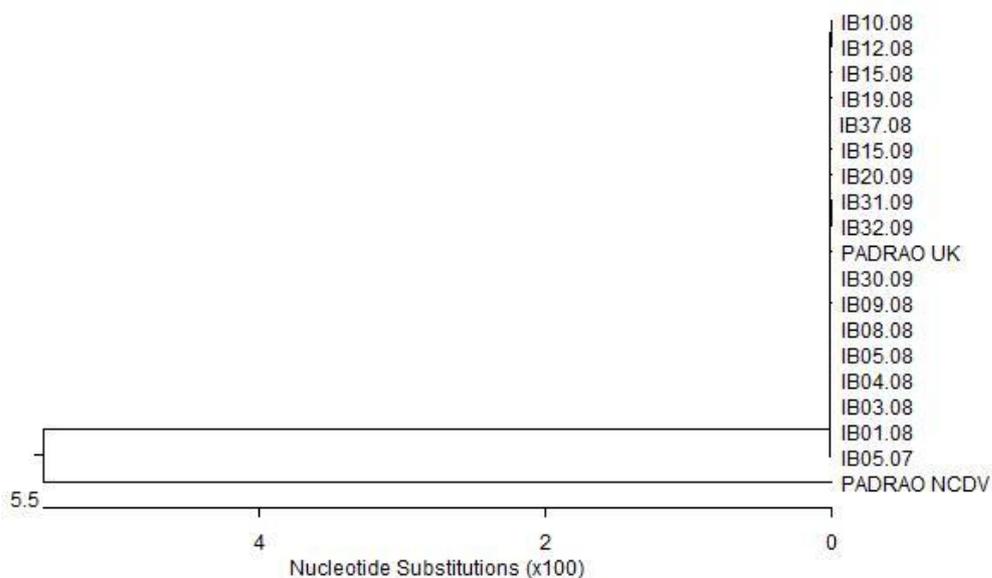
**Tabela 5.** Identidade das seqüências de nucleotídeos do genótipo G2 das amostras vacinais representativas de rotavírus e seqüência padrão G2.

	PADRÃO G2	IB 36.08	IB 21.09	IB 28.09	IB 30.09	PADRÃO G1
PADRÃO G2		100,0	100,0	100,0	100,0	75,0
IB 36.08			100,0	100,0	100,0	74,7
IB 21.09				100,0	100,0	74,7
IB 28.09					100,0	74,7
IB 30.09						74,7
PADRÃO G1						



**Figura 9:** Dendrograma indicando identidade das seqüências de nucleotídeos de amostras representativas do genótipo G2 da vacina contra rotavírus comparadas à seqüência da amostra UK-G2 padrão. A escala indica o número de resíduos de nucleotídeos divergentes.

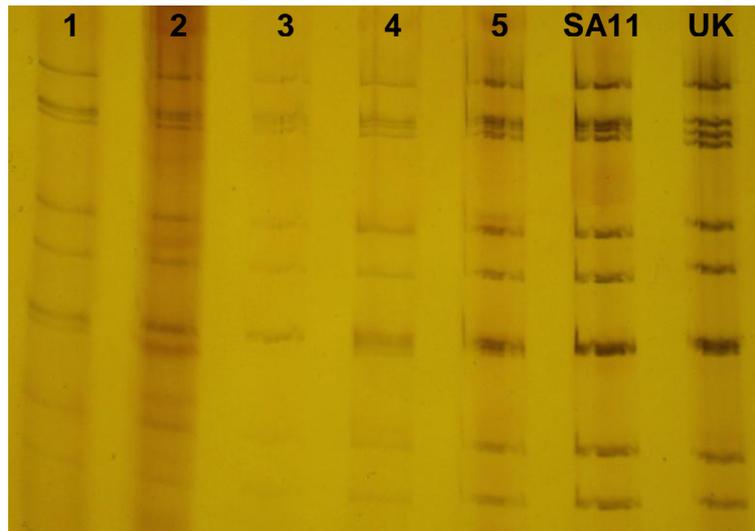




**Figura 10:** Dendrograma indicando identidade das seqüências de nucleotídeos do gene 4 de amostras representativas da vacina contra rotavírus comparadas à seqüência da amostra padrão UK e amostra padrão NCDV (rotavírus animal). A escala indica o número de resíduos de nucleotídeos divergentes.

#### 4.1.5. ANÁLISE DO PERFIL ELETROFORÉTICO

O genoma das amostras vacinais foi avaliado quanto ao perfil eletroforético em gel de poliácridamida no ensaio de EGPA. Exemplos dos perfis encontrados estão representados na **Figura 11**.



**Figura 11:** EGPA – perfil eletroforético de amostras representativas dos genótipos utilizados na vacina: canaletas 1 a 5: *reassortants* UK-G1, UK-G2, UK-G3, UK-G4 e UK-G9; amostras padrão de rotavirus SA11 (rotavirus símio) e UK (rotavirus bovino).

## **4.2. RESULTADOS DOS TESTES PRÉ-CLÍNICOS DE EXCREÇÃO E PRESENÇA DE ANTICORPOS NEUTRALIZANTES EM ANIMAIS**

### **4.2.1. PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE NEUTRALIZAÇÃO DE REDUÇÃO DE PLACAS**

O teste de **neutralização de redução de placas** (PRN) foi padronizado utilizando-se soros de voluntários pré e pós-infecção natural por rotavírus genótipos G1 e G9. Os testes foram realizados em três reações independentes e as médias dos resultados obtidos estão apresentadas na **Tabela 7**.

**Tabela 7.** Resultados do Teste de Neutralização por Redução de Placas (PRN) contra rotavírus em amostras pareadas de soro de voluntários com gastroenterite com excreção de rotavírus genótipo G1 (caso 1) e G9 (caso 2).

	UK-G1		UK-G2		UK-G3		UK-G4		UK-G9	
	S1	S2	S1	S2	S1	S2	S1	S2	S1	S2
CASO 1	80	1280*	160	320	40	40	160	320	80	160
CASO 2	<40	640	40	160	320	320	160	160	160	1280*

(\*) Soroconversão = aumento de 4 vezes no título de anticorpos entre soros coletados na fase aguda e fase convalescente.

#### 4.2.2. IMPLANTAÇÃO DA REAÇÃO DE NEUTRALIZAÇÃO DE REDUÇÃO DE PLACAS

Após padronização do teste, algumas amostras de soros dos coelhos pré e pós-imunização, coletados nos dias 0, 13 e 21, foram analisadas por soroneutralização (PRN) frente aos antígenos padrão dos 5 genótipos presentes na vacina contra rotavírus. Exemplos de alguns dos títulos obtidos estão apresentados na **Tabela 8**.

**Tabela 8.** Resultados de Neutralização de Redução de Placas (PRN) contra rotavírus em amostras pareadas de soro de coelho pré e pós-imunização.

		Título de anticorpos neutralizantes X Genótipos de rotavírus				
	DPI	UK-G1	UK-G2	UK-G3	UK-G4	UK-G9
Coelho	0	640	640	640	640	160
	13	2560	2560	640	10240	640
	21	2560	2560	2560	10240	640

DPI = Dias pós-inoculação

Atualmente, o teste está sendo utilizado para a pesquisa de anticorpos em soros pré e pós-vacinação de voluntários utilizados na fase I dos testes clínicos da vacina contra rotavírus produzida pelo Instituto Butantan.

#### 4.2.3. ELISA

Todas as 210 amostras de fezes de coelhos e as 210 de camundongos coletadas nos dias D0, D1, D2, D8, D9, D15 e D16 foram analisadas por ELISA para verificação da excreção viral. Sete coelhos excretaram rotavírus nas fezes. Essas amostras positivas foram identificadas

em fezes de coelhos que receberam placebo e que foram coletadas no dia D0 (zero) e no dia D8 (**Tabela 9**). Nenhum camundongo excretou rotavírus nas fezes.

**Tabela 9.** Resultados de excreção viral em coelhos inoculados com o a vacina contra rotavírus. Amostras de fezes coletadas nos dias D0, D1, D2, D8, D9, D15 e D16.

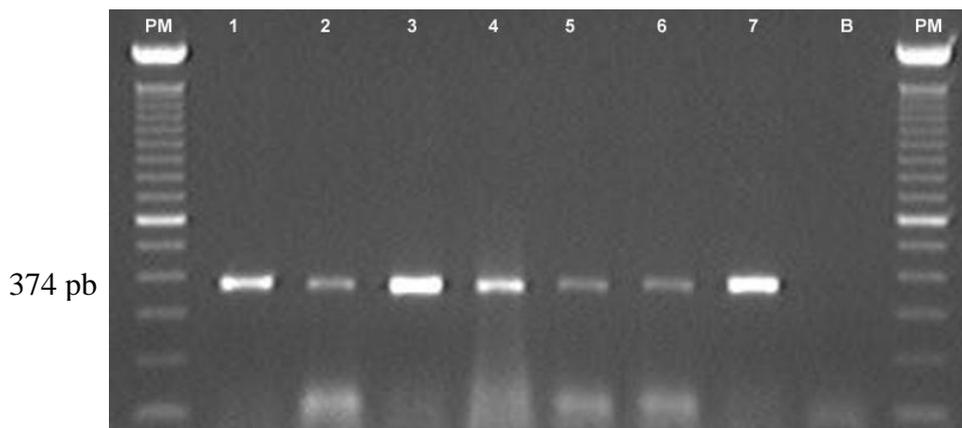
	GRUPOS	SEXO	VIA INOCULAÇÃO	COELHOS NÚMERO	RESULTADOS	
					ELISA	GENOTIPAGEM G / P
<b>1 Dose 2,6 x 10<sup>6</sup> PFU/dose</b>	Grupo 1	MACHO	Oral	Nº 01 - 05	Negativo	-
	Grupo 2	MACHO	Ip	Nº 06 - 10	Negativo	-
<b>3 Doses 1 x 10<sup>6</sup> PFU/dose</b>	Grupo 3	FÊMEA	Oral	Nº 11 - 15	Negativo	-
	Grupo 4	FÊMEA	Ip	Nº 16 - 20	Negativo	-
<b>3 Doses Placebo</b>	Grupo 5	FÊMEA	Oral	Nº 21 - 25	1 positivo D0 2 positivos D8	G3P[?]
	Grupo 6	FÊMEA/ MACHO	Ip	Nº 26 - 30	2 positivos D0 2 positivos D8	G3P[?]

D= Dia de coleta (0 e 8)

Ip = Intraperitoneal

#### 4.2.4. TÉCNICAS MOLECULARES PARA TESTES DE IDENTIDADE GENÉTICA

As amostras de coelhos positivos foram identificadas como rotavírus genótipo G3P[?] pela técnica de RT-PCR, utilizando os *primers* da Tabela 2. Os produtos de DNA obtidos pela amplificação dos genes 9 podem ser visualizados na **Figura 12**.



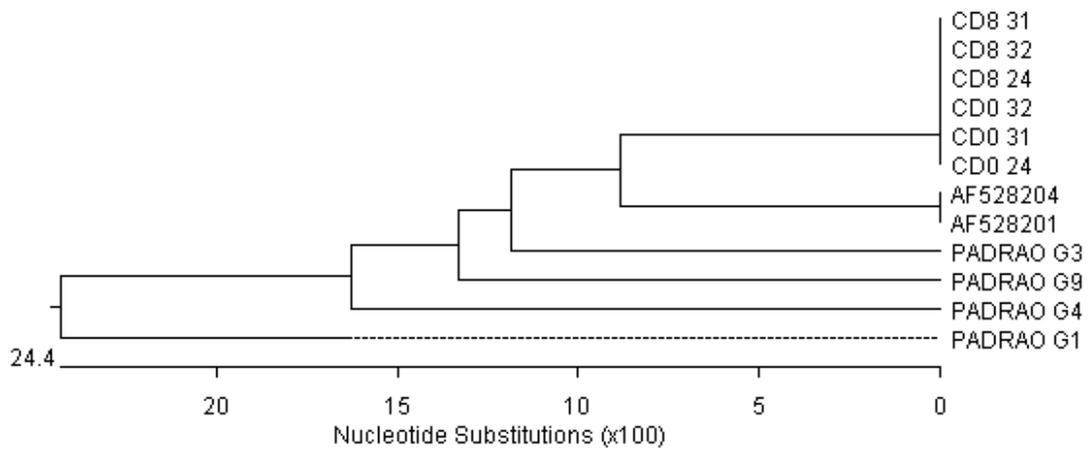
**Figura 12:** Produtos de PCR observados em gel de agarose das amostras dos coelhos positivos para rotavírus. Canaletas 1 a 7: genótipos G3 (VP7); PM - 100 pb – DNA Ladder; B, branco (controle de contaminação).

#### 4.2.5. SEQUENCIAMENTO GENÔMICO DAS AMOSTRAS ANIMAIS

Os produtos de PCR do gene 9 de seis amostras de coelhos foram seqüenciados e as seqüências obtidas foram alinhadas e comparadas com a seqüência da amostra padrão vacinal UK-G3 e de seqüências de amostras G3 de origem animal disponíveis no GenBank. Foi observada 78,1% de identidade entre as seqüências dos coelhos e do padrão vacinal UK-G3. A análise das seqüências dos coelhos quando comparadas com as seqüências de coelho disponíveis no GenBank: AF528201 e AF528204 demonstraram 83,2% de identidade. Os resultados estão representados na **Tabela 10** e **Figura 13**.

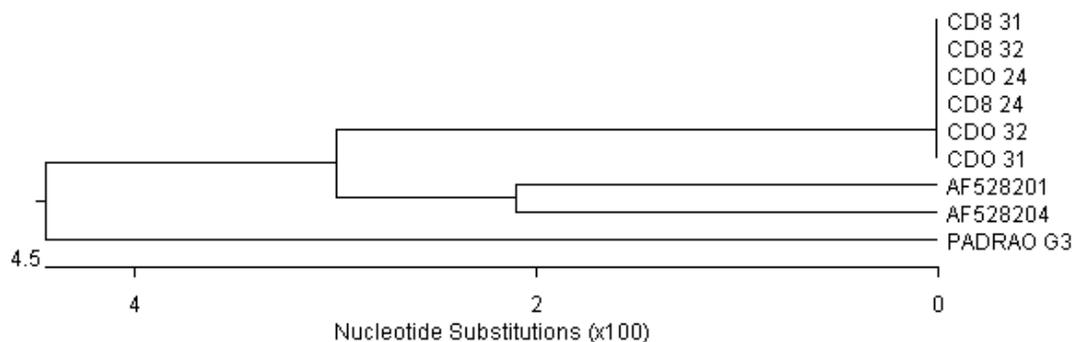
Em relação às seqüências dos aminoácidos deduzidos do gene 9, houve 94,4% de identidade entre as seqüências dos coelhos e as seqüências de coelho disponíveis no GenBank: AF528201 e AF528204 (**Tabela 10a** e **Figura 13a**).





**Figura 13.** Dendrograma indicando identidade das seqüências de nucleotídeos das amostras de genótipo G3 de coelhos inoculados com rotavírus comparadas a sequência da amostra padrão UK-G3 e amostras padrão UK-G1, UK-G4 e UK-G9 e amostras de coelhos do Genbank: AF528201 e AF528204. A escala indica o número de resíduos de nucleotídeos divergentes.





**Figura 13a.** Dendrograma indicando identidade das seqüências de aminoácidos das amostras de genótipo G3 de coelhos inoculados com rotavírus comparadas a sequênciada amostra padrão UK-G3 e amostras de coelho do GenBank: AF528201 e AF528204. A escala indica o número de resíduos de nucleotídeos divergentes.

As seqüências de aminoácidos deduzidas das amostras de G3 de coelhos inoculados com rotavírus foram comparadas, analisando-se as regiões hipervariáveis A, B, C, D, E e F (**Figura 14**). Em relação às outras amostras de coelhos encontradas no GenBank (AF528201 e AF528204) foram observadas 2, 1, 1, 1, 3, substituições nas regiões A, B, C, D e E, respectivamente. Não foram encontradas substituições na região F, comparando-se as amostras estudadas e as de coelhos.

Todas as amostras apresentam um sítio glicosilado localizado no aa 69 (Asn), que é encontrado em todos os sorotipos G3 de Lapine e tende a ser conservado entre todas as amostras de rotavírus G3.

O gene 4 de rotavírus dos coelhos ainda está sendo estudado. Não houve formação de produtos de PCR utilizando os *primers* clássicos, entretanto *primers* específicos para o gene 4 de coelhos: P[22] e P[14] estão sendo sintetizados.

CD0 24 M D F I I Y R F L F I V V I L S P L L K A Q N Y G I N L P I  
 CD0 31 . . . . .  
 CD0 32 . . . . .  
 CD8 24 . . . . .  
 CD8 31 . . . . .  
 CD8 32 . . . . .  
 AF528201 . . . V . . . . I . V . . . . .  
 AF528204 . . . V . . . . I . V . . . . .  
 PADRÃO G3 . . . . . L . I . . . . . N

CD0 24 T G S M D T A Y A N S T Q E E I F L T S T L C L Y Y P T E A  
 CD0 31 . . . . .  
 CD0 32 . . . . .  
 CD8 24 . . . . .  
 CD8 31 . . . . .  
 CD8 32 . . . . .  
 AF528201 . . . . T . . . . R . T . . . . .  
 AF528204 . . . . T . . . . R . T . . . . .  
 PADRÃO G3 . . . . P . T . M R . V . . . . .

CD0 24 V T E I N D N S W K D T L S Q L F L T K G W P T G S V Y F K  
 CD0 31 . . . . .  
 CD0 32 . . . . .  
 CD8 24 . . . . .  
 CD8 31 . . . . .  
 CD8 32 . . . . .  
 AF528201 A . . . . . R  
 AF528204 A . . . . . R  
 PADRÃO G3 A . . . . . K

CD0 24 E Y T D I A S F S V D P Q L Y C D Y N V V L M K Y D A T L Q  
 CD0 31 . . . . .  
 CD0 32 . . . . .  
 CD8 24 . . . . .  
 CD8 31 . . . . .  
 CD8 32 . . . . .  
 AF528201 . . . . V . . . . . A  
 AF528204 . . . . V . . . . . A  
 PADRÃO G3 D . . . . M . . . . L . . . . .

CD0 24 L D M S E L A D L I L N E W L C N P M D I T L Y Y Y Q Q T D  
 CD0 31 . . . . .  
 CD0 32 . . . . .  
 CD8 24 . . . . .  
 CD8 31 . . . . .  
 CD8 32 . . . . .  
 AF528201 . . . . .  
 AF528204 . . . . .  
 PADRÃO G3 . . . . . L . . . . .

CD0 24 E A N K W I S M G S S C T I K V C P L N T Q T L G I G C L T  
 CD0 31 . . . . .  
 CD0 32 . . . . .  
 CD8 24 . . . . .



## *5. DISCUSSÃO*

## 5. DISCUSSÃO

Rotavírus são a causa mais comum de diarreia aguda grave em crianças. A incidência é aproximadamente a mesma em todo o mundo, independente da qualidade da água, higiene e condições sócio-econômicas. O rotavírus é resistente e altamente contagioso. Quase todas as crianças são infectadas por rotavírus antes dos 2 anos de idade, faixa etária de maior risco para formas graves da doença diarreica (Parashar *et al*, 2006).

Para reduzir o índice de mortalidade e hospitalização em crianças de todo o mundo, vários estudos para desenvolvimento de vacinas contra rotavírus têm sido realizados desde o início da década de 80. Atualmente, há três vacinas licenciadas sendo administradas em várias regiões do mundo, e outras em fase de desenvolvimento. A diversidade genética e antigênica dos rotavírus gera discussões sobre a composição da vacina a ser empregada nos diversos países bem como, sobre a segurança dessa vacina após administração em larga escala na população (Estes e Kapikian, 2007).

No Brasil a vacina contra rotavírus Rotarix<sup>®</sup> (GlaxoSmithKline), monovalente (G1P[8]), foi licenciada em 2005 e introduzida em março de 2006 no Programa Nacional de Imunizações do Brasil pelo Ministério da Saúde (MS). Paralelamente, o Instituto Butantan (IB) estabeleceu parceria com o NIH (National Institute of Health, EUA) para o repasse de tecnologia da vacina contra rotavírus BRV (UK), tetravalente, desenvolvida a partir de rotavírus *reassortant* humano-bovino (G1-4 humano - UK), com o financiamento do MS e de organizações internacionais. Outros laboratórios da Índia, China, além do Brasil estão desenvolvendo a mesma plataforma com o apoio da PATH (Program for Appropriate Technologies in Health; [http://www.path.org/projects/rotavirus\\_vaccine.php](http://www.path.org/projects/rotavirus_vaccine.php)).

Devido à experiência em rotavírus, o Instituto Adolfo Lutz (IAL) foi convidado a participar do controle de qualidade da vacina produzida pelo IB, na realização dos testes de potência e de identidade genética das amostras vacinais, e dos testes pré-clínicos da vacina contra rotavírus. Com essa nova atribuição, várias metodologias precisaram ser padronizadas e implantadas

para utilização nos testes de potência e identidade genética nas diferentes etapas de produção da vacina e nas fases de ensaios pré-clínicos da vacina contra rotavírus BRV-UK/Hu.

Este trabalho apresenta a padronização e implantação de metodologias para ensaios necessários às análises citadas, de acordo com as recomendações da OMS e da ANVISA para produção de vacinas (WHO, 2005).

Para se verificar a potência das amostras virais das vacinas monovalentes foi escolhida a técnica de titulação viral por plaqueamento (PFU), visto que os rotavírus apresentam efeito citopático não característico (Wyatt *et al*, 1980). A técnica de plaqueamento, descrita por Hoshino *et al*. (1984) e já empregada por Timenetsky *et al* (1998), necessitou de adaptações para utilização nas metodologias propostas. Inicialmente, foram realizados ensaios para a determinação da concentração celular ideal para a formação da monocamada de células para a realização dos testes e da sensibilidade das culturas celulares para o plaqueamento. As amostras vacinais foram produzidas em culturas celulares da linhagem Vero (rim de macaco verde) de baixa passagem, porém os testes foram realizados em células MA104. A linhagem MA104 foi escolhida por ser mais sensível para a replicação dos rotavírus facilitando a visualização das placas, em relação ao tamanho e tempo de formação de placas de lise e por maior facilidade de subcultivo (Smith *et al.*, 1979). As culturas celulares de MA104 foram utilizadas da passagem 55 a 76, pois foi observado o limite de co-cultivos para a obtenção de placas de lise que permitissem leituras. Foi observado que as culturas celulares com passagem superior a 76 (77 a 82) apresentavam irregularidade na formação das placas de lise, não ocorrendo uniformidade de resultados. Wyatt *et al* (1980) em seu estudo para isolamento de rotavírus em cultura celular comenta a necessidade de utilização da linhagem MA104 até o limite de 72 co-cultivos.

A necessidade de ajuste do pH do meio semi-sólido (*overlay*), para possibilitar a formação de placas de lise, também foi observada. Este detalhe não está apontado em nenhuma das técnicas consultadas (Hoshino

*et al.*, 1984, Wyatt *et al.*, 1982) nem mesmo foi observado pelo laboratório de referência em rotavírus (NIH).

Vários investigadores (Dahling *et al.*, 1989) têm indicado possíveis fatores que podem contribuir para erros na contagem de placas de lise. Esses incluem partículas tóxicas ou amostras que causem crescimento irregular das células; contaminação bacteriana ou fúngica que podem produzir colônias rodeadas por áreas de lise que podem ser confundidas por placas de vírus; material estranho (como partículas, bolhas de ar e irregularidades da monocamada celular) que pode combinar para produzir aparência de áreas de lise por vírus na monocamada celular. Placas virais verdadeiras são usualmente arredondadas uniformemente e opacas, aumentando o tamanho circular diariamente e não apresentam pontos centrais.

Para a padronização da técnica de titulação viral por plaqueamento foram utilizadas amostras padrão de rotavírus cedidas pelo NIH. A metodologia padronizada no IAL foi repassada para o IB para ser empregada na titulação dos lotes de vacina em produção, e o IAL realizou o controle de qualidade dos testes de potência da vacina produzida. Para a validação do teste de titulação por plaqueamento, as mesmas amostras virais foram testadas em duplicata nos laboratórios de rotavírus do IAL, IB e NIH para controle de qualidade externo.

Amostras de vírus vacinais coletadas nas diferentes etapas de produção da vacina foram tituladas pela técnica de plaqueamento, resultando em títulos por unidade formadora de placa (PFU) por mL. Os ensaios foram utilizados como teste de potência das amostras vacinais, para o cálculo da concentração necessária para a composição da vacina pentavalente de rotavírus. O chamado “teste de potência” para a vacina de rotavírus é realizado pela metodologia de PFU que resulta na concentração dos vírus presentes em cada amostra vacinal.

Amostras de rotavírus padrão também foram tituladas pela técnica de plaqueamento para serem utilizadas na padronização da reação de soroneutralização (PRN) e para os testes realizados nos soros de animais

utilizados nos testes pré-clínicos. O título dos vírus padrão foi determinado pela média dos títulos de três reações independentes para cada tipo de rotavírus (Wyatt *et al*, 1982). A técnica foi criteriosamente adaptada para permitir a reprodutibilidade dos resultados. Na ausência de soros padrão, a metodologia foi padronizada utilizando-se soros de voluntários pré e pós-infecção natural por rotavírus genótipos G1 e G9 (**Tabela 4**) e amostras de rotavírus padrão (UK-G1-4 e G9). A soroconversão nesses voluntários ocorreu para o antígeno específico com o qual o indivíduo havia se infectado, embora apresentassem título de anticorpos neutralizantes contra os outros antígenos. Este fato é esperado já que os soros testados pertenciam a indivíduos adultos, que certamente já tiveram contato com rotavírus e, portanto, apresentam anticorpos contra rotavírus no intestino que podem causar imunidade cruzada. Estudo divulgado por Ward *et al* (1989) observou que todos os adultos utilizados em seu estudo haviam sido infectados por rotavírus anteriormente, pois possuíam anticorpos neutralizantes contra esse vírus. Apesar da presença de anticorpos a diarreia causada por rotavírus em adultos é resultado de reinfecção devido à exposição a diferentes sorotipos de rotavírus (Ward *et al*, 1986).

Cao *et al* (2009) estudando a resposta sorológica em bezerros desafiados com vacina de rotavírus, verificaram conversão sorológica para mais de um sorotipo simultaneamente, sugerindo a presença de vários anticorpos específicos no intestino dos voluntários no momento da vacinação.

Kapikian *et al* (1983) demonstraram que a vacinação contra rotavírus induziu em voluntários adultos a produção de anticorpos neutralizantes contra a vacina e também, contra outros sorotipos. Os anticorpos heterotípicos eram produzidos devidos, em parte, a resposta de memória às infecções prévias por rotavírus. No entanto, respostas heterotípicas também são relatadas em crianças, muitas das quais provavelmente já tiveram infecção primária por rotavírus (Chiba *et al.*, 1986, Clark *et al.*, 1985). Infecções primárias por rotavírus induzem a resposta humoral sorotipo-específica provendo imunidade homotípica. Proteção parcial contra

infecções subseqüentes por outros sorotipos de rotavírus também desenvolve e aumenta com o número de re-infecções (Velázquez *et al.*, 1996). Infecção natural ou vacinação apropriada parecem proteger contra diarreia grave nas infecções subseqüentes, mesmo se o sorotipo do vírus for diferente daquele observado na infecção prévia ou daquele utilizado na vacina (Velázquez *et al.*, 1996, Franco *et al.*, 2006). Reinfecções por rotavírus são comuns em pessoas de todas as idades, mas os sintomas da doença são geralmente menos grave em adultos, sendo comum infecções sub-clínicas (Ward *et al.*, 1989).

A padronização e implantação da técnica de Neutralização de Redução de Placas (PRN) permitiram a detecção de anticorpos para cada sorotipo que compõe a vacina polivalente, metodologia esta necessária para os testes clínicos da vacina de rotavírus. Essa técnica foi utilizada em outros testes clínicos como os da vacina RRV-TV (Rotashield®, BioVirx, EUA) e BRV-UK realizados entre 1997 e 1999, na Finlândia.

A técnica de PRN é altamente específica, mas apresenta limitações por ser extremamente laboriosa e demorada. Outras técnicas estão sendo padronizadas para agilizar os testes clínicos de fase II e III, como a técnica neutralização de foco fluorescente (Knowlton *et al.*, 1991) e a do ensaio imunoenzimático (ELISA) para a detecção de IgA.

As técnicas que se baseiam na detecção de foco fluorescente, como a titulação (FFU) e a neutralização (NFF) (Knowlton *et al.*, 1991) demandam menor tempo para a execução e, por serem realizadas em microplacas de 96 orifícios, permite a execução simultânea de maior número de amostras. Essas técnicas utilizam anticorpos monoclonais específicos para cada sorotipo de rotavírus. Até o momento, o Núcleo de Doenças Entéricas não dispõe de anticorpos monoclonais específicos para os sorotipos G3 (UK-G3) e G9 (UK-G9), componentes da vacina produzida no IB. Devido a problemas operacionais a companhia internacional responsável pela produção e distribuição dos reagentes padrão ainda não conseguiu produzir esses reagentes em escala suficiente para suprir os laboratórios produtores,

impossibilitando a utilização das técnicas de fluorescência para a titulação viral e testes pré-clínicos.

Para estudo da resposta imune em voluntários vacinados com a vacina de rotavírus está sendo padronizada a técnica de ELISA para a detecção de IgA. Essa técnica será utilizada nos testes clínicos de Fase I, II e III, utilizando reagentes padronizados e distribuídos a todos os laboratórios que participarão dos testes vacinais. A detecção da IgA secretada pela superfície da mucosa intestinal pode ser um importante marcador de resposta imunológica associado com proteção à infecção e doença moderada à grave. No entanto, esta correlação não estabelece necessariamente que as imunoglobulinas do tipo IgA são o único mediador de proteção, mas que este é um importante marcador de proteção imunológica (Velázquez *et al.*, 2000).

Em relação aos testes de identidade genética, foram utilizados protocolos previamente padronizados (Gentsh *et al.*, 1992, Gouvêa *et al.*, 1990, 1994, Timenetsky *et al.*, 1994, 1998) e implantados no Núcleo de Doenças Entéricas desde 1995. Os protocolos para os testes de identidade genética dos protótipos vacinais *reassortants* foram padronizados utilizando-se amostras padrão recebidas do NIH, realizadas por 3 analistas independentemente. Essas amostras foram utilizadas como controles nos testes de identidade genética das alíquotas dos vírus obtidos nas diferentes etapas de produção da vacina.

As seqüências obtidas dos genes codificadores da VP7 e da VP4 das amostras vacinais foram comparadas às seqüências dos vírus padrões apresentando alta identidade genética.

A padronização da técnica de sequenciamento dos vírus G2 (UK-G2) foi possível com o emprego de *pool* de *primer* específico para o gene 9 *reassortant* G2 (UK-G2). A não amplificação de todo o gene 9 de algumas amostras de genótipo G2, utilizando os *pools* de *primer* Beg9-End9 e antiA1-RVG9, exigiu alterações no protocolo como a utilização de diferentes quantidades de amostra de RNA<sub>df</sub> (5µL e 3µL), na tentativa de reduzir possíveis inibidores da reação de RT-PCR. Para aumentar a sensibilidade

da RT-PCR diminuiu-se a temperatura de anelamento, com diminuição da especificidade da reação. Verificou-se que a amplificação de produtos *reassortants* UK-G2 só foi possível com a utilização do *pool* de primers anti A1-aCT2, possibilitando, assim o seqüenciamento dos produtos com 100% de identidade genética com a amostra padrão.

O mesmo ocorreu em relação ao gene 4 de algumas amostras, que não foram amplificadas utilizando o *pool* de *primer* Con2-Con3 e, então, o sequenciamento foi realizado a partir do produto de PCR genótipo P[5] (UK). Todas as amostras apresentaram 100% de identidade em comparação à amostra padrão.

Segundo recomendações da OMS e ANVISA, para verificação da identidade genética das amostras vacinais deve se proceder a análise molecular por seqüenciamento do gene 9 dos produtos obtidos nas diferentes fases da produção da vacina.

Algumas das amostras vacinais estudadas neste trabalho foram enviadas ao NIH para realização do sequenciamento de todos os genes do rotavírus, procedimento esse, realizado por todos os outros países que estão desenvolvendo a vacina. Estamos implantando o mesmo protocolo para análise dos próximos lotes de vacina a serem utilizados nos testes de fase II e III.

A análise das regiões hipervariáveis das seqüências não revelou alteração de aminoácidos na VP7 dos vírus vacinais como resultado das passagens seriadas em células Vero. As passagens em células Vero minimamente afetam as seqüências de aminoácidos de proteínas dos vírus vacinais na vacina BRV (Patton J, comunicação pessoal).

As células Vero são células de linhagem contínua, aneuplóide e com crescimento indefinido em meio de cultura. Esta linhagem é uma das mais amplamente aceitas pelas autoridades regulatórias de todo o mundo para produção de vacinas. Elas são utilizadas há mais de 30 anos, na produção das vacinas contra poliovírus e raiva. Diversas vacinas, como a vacina contra raiva, dengue, poliovírus, varíola e novas vacinas contra influenza, além do rotavírus, são produzidas em células Vero, pois estas células

podem crescer em altas concentrações no interior de biorreatores, sem que seja necessário o uso de soros de origem humana ou animal. Com isso, há menos traços de DNA animal, garantindo maior pureza na composição final da vacina. A produção de vacinas utilizando a linhagem Vero é altamente recomendada pela OMS (Barret *et al.*, 2009).

A implantação das técnicas citadas permitiu a realização dos testes de identidade genética e a titulação das vacinas monovalentes G1 (UK-G1), G2 (UK-G2), G3 (UK-G3), G4 (UK-G4) e G9 (UK-G9), possibilitando a produção da vacina pentavalente G1-4 e G9 RH-UK BV pelo IB.

Como recomendações das agências regulamentadoras, são necessários ensaios pré-clínicos para avaliar os parâmetros de segurança e eficácia da vacina, por meio de estudos de toxicidade e de atividade *in vitro* e *in vivo*. Para a avaliação da vacina contra rotavírus produzida pelo IB, coelhos e camundongos foram desafiados e, posteriormente, testes sanguíneos e anatomopatológicos foram realizados nesses animais. O IAL recebeu amostras de fezes e soro dos coelhos e camundongos para realizar os testes de excreção viral e dosagem de anticorpos neutralizantes contra o rotavírus ou placebo. Observou-se excreção viral em 7 coelhos não imunizados, que foram retirados do estudo. A detecção de rotavírus nestes animais já no dia 0 de coleta, sugeriu a utilização de uma população de coelhos infectada endemicamente.

Em seu estudo, DiGiacomo e Thouless (1986) observaram que os coelhos recebiam anticorpos de suas mães por via transplacentária e que esses anticorpos declinavam rapidamente. Porém, com 2 a 3 meses de idade, a maioria destes coelhos testados (>90%) adquiriu novamente anticorpos contra rotavírus, sugerindo que os rotavírus seriam endêmicos em populações de coelhos. Conner *et al* (1988) observaram que o uso bem sucedido de coelhos como modelo animal para estudos da infecção por rotavírus é duvidoso, pois requer que estes animais sejam mantidos em isolamento total. Estes autores também apresentam a necessidade de monitoramento rotineiro destes animais para garantir que não haja falha no isolamento. No entanto, os coelhos continuam sendo um modelo animal que

supera as restrições e limitações de outros modelos animais para o estudo das infecções por rotavírus. Dentre as vantagens deste modelo pode-se citar: tamanho do animal que facilita a coleta de amostras e a fácil manipulação dos animais; idade suscetível aumentada (acima de 16 semanas); custo moderado, quando comparado a animais de grande porte; diferentes amostras virais podem infectar os coelhos.

Neste estudo, a excreção do vírus vacinal (*reassortant* humano/bovino) não era esperada. Este vírus vacinal *reassortant* é capaz de induzir resposta imune, mas apresenta baixa capacidade de replicação nos animais. A pesquisa da excreção viral nas fezes dos animais sugere a não replicação do vírus *reassortant* bovino-humano nos animais desafiados.

Esses animais não foram investigados quanto à presença de anticorpos para rotavírus antes da vacinação e, aliado ao fato da presença de rotavírus no grupo placebo, a ausência de excreção viral nos animais vacinados pode ser devido à proteção dos coelhos por infecção natural prévia. A técnica de neutralização (PRN) empregada nos testes pré-clínicos em coelhos demonstrou a existência de anticorpos nos animais antes do desafio (Tabela 5), fator este que pode ter inibido a replicação viral e, conseqüentemente, a excreção do vírus vacinal. Ciarlet *et al* (1998) demonstrou que coelhos que apresentam anticorpos contra rotavírus não excretam vírus ao serem desafiados.

Os rotavírus identificados nos animais que receberam placebo, genótipo G3P[?], não apresentou identidade genômica com a amostra UK-G3 vacinal. Ao compararmos as seqüências obtidas encontramos maior índice de identidade com seqüências G3 de coelhos. A análise das regiões hipervariáveis das seqüências dos aminoácidos deduzidos das amostras dos coelhos revelou a ocorrência de substituições residuais nas regiões A, B, C, D e E, quando comparadas às seqüências das amostras vacinais UK-G3, embora a identidade apresentada em relação às outras seqüências de G3 animais encontradas no GenBank seja alta 94,4%. Esta afirmação é corroborada por estudos de Ciarlet *et al* (1997) que afirma que a porcentagem de identidade de aminoácidos (98,5 a 94,2%) encontrada entre

suas amostras de coelhos genótipo G3 é alta e pode confirmar a classificação sorológica do vírus. Martella *et al* (2003) também se refere à alta identidade de aminoácidos (95 a 96%) encontrada entre suas amostras de coelhos.

As seqüências de aminoácidos do gene 9 de todos os coelhos deste estudo apresentaram um sítio glicosilado localizado no aminoácido 69 (Asn), que também é encontrado em todos os sorotipos G3 de coelhos e tende a ser conservado na maioria das amostras de rotavírus (Martella *et al.*, 2003).

O genótipo G3 tem sido descrito em muitas espécies animais, sendo o único genótipo identificado em coelhos (Martella *et al*, 2005). O encontro de rotavírus em amostras de coelhos de laboratório demonstra a importância da monitoração da excreção viral nos animais utilizados em experimentação. É importante salientar que há necessidade de dosagem de anticorpos neutralizantes e da excreção viral em animais, antes do início dos procedimentos de vacinações.

O emprego de protocolos e reagentes padronizados é essencial para a comparação de resultados obtidos nos testes das vacinas UK contra rotavírus produzidas nos diferentes laboratórios.

A continuidade deste estudo prevê o sequenciamento do gene 4 dos rotavírus encontrados nos coelhos, a fim de melhor caracterizar estas amostras e o término do teste de dosagem de anticorpos neutralizantes nos soros de todos os animais.

A técnica de titulação viral e caracterização molecular continuarão sendo empregadas para o monitoramento de todas as amostras vacinais produzidas pelo IB.

## **6. CONCLUSÕES**

## **6. CONCLUSÕES**

1. A padronização das metodologias para os testes de potência das vacinas monovalentes contra rotavírus permitiu o controle da vacina pentavalente BRV-UK produzida pelo IB.
2. A técnica de neutralização (PRN) foi padronizada neste estudo e será utilizada nos testes de fase I da vacina de rotavírus para avaliar a imunogenicidade dos sorotipos que compõe a vacina pentavalente BRV-UK produzida pelo IB.
3. A implantação das técnicas moleculares permitiu verificar a identidade genética das amostras vacinais, das vacinas monovalentes e da vacina pentavalente BRV-UK, durante o processo de produção da vacina pelo IB.
4. A análise da excreção viral nos testes pré-clínicos demonstrou a necessidade de se testar previamente os animais de experimentação frente à presença de vírus e anticorpos contra o vírus a ser desafiado.

## *7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alam MM, Kobayashi N, Ishino M, Ahmed MS, Ahmed MU, Paul SK et al. Genetic analysis of an ADRV-N-like novel rotavirus strain B219 detected in a sporadic case of adult diarrhea in Bangladesh. *Arch Virol.* 2007; 152: 199–208.

Araujo EC, Clemens SAC, Oliveira CS, Justino MCA, Rubio P, Gabbay YB, et al. Safety, immunogenicity, and protective efficacy of two doses of RIX4414 live attenuated human rotavirus vaccine in healthy Brazilian infants. *J Pediat.* 2007; 83 (3).

Araujo IT, Ferreira MSR, Fialho AM, Assis RM, Cruz CM, Rocha M, Leite JPG. Rotavirus genotypes P[4]G9, P[6]G9 and P[8]G9 in hospitalized children with acute gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Microbiol.* 2001; 39 (5): 1999-2001.

Ball MJ, Tian P, Zeng CQY, Morris AP, Estes MK. Age-dependent diarrhea induced by a rotaviral nonstructural glycoprotein. *Science* 1996; 272: 101-104.

Barret PN, Mundt W, Kistner O, Howard MK. Vero cell platform in vaccine production: moving towards cell culture-based viral vaccines. *Exp Rev Vac.* 2009; 8 (5), 607-618.

Bishop RF, Barnes GL, Cipriani E, Lund JS. Clinical immunity after neonatal rotavirus infection. A prospective rotavirus infection against subsequent rotavirus diarrhea. *N Engl J Med.* 1983; 309, 72-76.

Cao D, Igboeli B, Yuan L, Kapikian AZ, Ayers JL, Abinanti FR, Hoshino Y. A longitudinal cohort study in calves evaluated for rotavirus infections from 1 to

12 months of age by sequential serological assays. *Arch Virol.* 2009; 154: 755-763.

Carmona RCC, Timenetsky MCST, Silva FF, Granato CFH. Characterization of rotavirus strains from hospitalized and outpatient children with acute diarrhoea in São Paulo, Brazil. *J Med Virol.* 2004; 74: 166-172.

Carvalho-Costa FA, Assis RM, Fialho AM, Boia MN, Alves DP, Martins CM, Leite JP. Detection and molecular characterization of group A rotavirus from hospitalized children in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006; 101 (3): 291-294.

Castro L, Rodrigues DP, Flauzino R, Moura M, Leite JPG. An outbreak of diarrhoea associated with rotavirus serotype 1 in a day care nursery in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1994; 89 (1): 5-9.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. Intussusception among recipients of rotavirus vaccine – United States, 1998-1999. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 1999; 48: 577-81.

Ciarlet M, Gilger MA, Barone C, McArthur M, Estes MK, Conner ME. Rotavirus disease, but not infection and development of intestinal histopathological lesions, is age restricted in rabbits. *Virology* 1998; 251(2): 343-360.

Ciarlet M, Estes MK, Conner ME. Comparative amino acid sequence analysis of the outer capsid protein VP4 from four lapine rotavirus strains reveals identity with genotype P[14] human rotaviruses. *Arch Virol.* 1997; 142: 1059-1069.

Chiba S, Nakata T, Urasawa S, Urasawa T, Yokoyama Y, Morita K et al. Protective effect of naturally acquired homotypic and rotavirus antibodies. *Lancet* 1986; ii: 417-421.

Chomczynski P & Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987; 162(1):156-159.

Clark HF, Dolan KT, Horton-Slight P, Palmer J, Plotkin SA. Diverse serologic response to rotavirus infection of infants in a single epidemic. *Pediatric Infect Dis.* 1985; 4: 626-631.

Conner ME, Estes MK, Graham DY. Rabbit model of rotavirus infection. *J Virol.* 1988; 62 (5): 1625-1633.

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

CVE - Centro de Vigilância Epidemiológica "Prof. Alexandre Vranjac". Vacina contra rotavírus. São Paulo (SP); 2006.

Dahling DR, Sullivan G, Freyberg RW, Safferman RS. Factors affecting virus plaque confirmation procedures. *J Virol Meth.* 1989; 24: 111-22.

Das BK, Gentsh JR, Cicirello HG, Woods PA, Gupta A, Ramachandran M et al. Characterization of rotavirus strains from newborns in New Delhi, India. *J Clin Microbiol.* 1994; 1820-1822.

De Vos B, Vesikari T, Linhares AC, Salinas B, Perez-Schael I, Ruiz – Palacios GM et al. A rotavirus vaccine for prophylaxis of infants against rotavirus gastroenteritis. *Ped Infect Dis J.* 2004; 23: S179-182.

Dennehy PH. Rotavirus vaccines: an overview. *Clin Microbiol Rev.* 2008; 21 (1): 198-208.

Desselberger U, Manktelow E, Li W, Cheung W, Iturriza-Gómara M, Gray J. Rotaviruses and rotavirus vaccines. *British Medical Bull.* 2009; 1-15.

DiGiacomo RF & Thouless ME. Epidemiology of naturally occurring rotavirus infection in rabbits. *Lab Anim Sci.* 1986; 36: 153-156.

Esona MD, Geyer A, Bányai K, Page N, Aminu M, Armah GE et al. Novel human rotavirus genotype G5p[7] from child with diarrhea, Cameroon. *Emerg Infect Dis.* 2009; 15(1): 83-86.

Estes MK & Kapikian AZ. Rotaviruses. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Martin MA, Lamb RA, Roizman B, Straus SE, editors, *Fields. Virology*, 5th ed., vol.2. Philadelphia, PA:Lippincott – Raven 2007; p.1918-1974.

Estes MK, Graham DY, Smith EM, Gerba CP. Rotavirus stability and inactivation. *J Gen Virol.* 1979; 43, 403-409.

Franco MA, Angel J, Greenberg HB. Immunity and correlates of protection for rotavirus vaccines. *Vaccine* 2006; 24: 2718-2731.

Gentsch JR, Glass RI, Woods P, Gouvea V, Gorziglia M, Flores J et al. Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 1365-1373.

Gouvea V, Santos N, Timenetsky MC. VP4 typing of bovine and porcine group A rotaviruses by PCR. *J Clin Microbiol.* 1994; 1333-1337.

Gouvea V, Castro L, Timenetsky MC, Greenberg H, Santos N. Rotavirus serotype G5 associated with diarrhea in Brazilian children. *J Clin Microbiol.* 1994a; 32: 1408-1409.

Gouvea V, Glass RI, Woods P, Taniguchi K, Clark HF, Forrester B, Fang ZY. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *J Clin Microbiol.* 1990; 28: 276-282.

Graham DY & Estes MK. Pathogenesis and treatment of rotavirus diarrhea. *Gastroenterology* 1991; 101: 1140-1141.

Greenberg HB, Wyatt RG, Kapikian AZ, Kalica AR, Flores J, Jones R. Rescue and serotypic characterization of noncultivable human rotavirus by gene reassortment. *Infect Immun.* 1982; 37: 104-109.

Guerrant RL, Carneiro-Filho BA, Dillingham RA. Cholera, diarrhea, and oral rehydration therapy: triumph and indictment. *Clin Infect Dis.* 2003; 37(3):398-405.

Hoshino Y & Kapikian AZ. Rotavirus antigens. In: *ROTAVIRUSES*. Ed. RF Ramig. Berlin Springer – Verlag, 1994; p. 180-227.

Hoshino Y, Gorziglia M, Valdesuno J, Askaa J, Glass RI, Kapikian AZ. An equine rotavirus (FI-14 strain) which bears both subgroup I and subgroup II specificities on its VP6. *Virology* 1987; 157: 488-496.

Hoshino Y, Wyatt RG, Greenberg HB, Flores J, Kapikian AZ. Serotypic similarity and diversity of mammalian and avian origin as studied by plaque reduction neutralization. *J Infect Dis* 1984; 149: 694-702.

Hyser JM & Estes MK. Rotavirus vaccines and pathogenesis: 2008. *Curr Opin Gastroenterol.* 2008; 25: 36-43.

Jiang JQ, He XS, Feng N, Greenberg HB. Qualitative and quantitative characteristics of rotavirus-specific CD8 T cells vary depending on the route of infection. *J Virol.* 2008; 82: 6812-6819.

Jourdan N, Brunet JP, Sapin C, Blais A, Cotte-Laffitte J, Forester F et al. Rotavirus infection reduces sucrase-isomaltase expression in human intestinal epithelial cells by perturbing protein targeting and organization of microvillar cytoskeleton. *J Virol.* 1998; 72: 7228-7236.

Kang G. Rotavirus vaccines. *Indian J Med Microbiol.* 2006; 24:252-257.

Kapikian AZ, Simonsen L, Vesikari T, Hoshino Y, Morens DM, Chanock RM et al. A hexavalent human rotavirus-bovine rotavirus (UK) reassortant vaccine designed for use in a schedule with the potential to eliminate the risk of intussusception. *J Infect Dis.* 2005; 192-S22-29.

Kapikian AZ. Viral gastroenteritis. In: Evans AS, Kaslow RA, editors. *Viral infection of humans: epidemiology and control.* 4 ed., New York and London Plenum Medical Book Company, 1997; p. 285-343.

Kapikian AZ & Chanock RM. Rotaviruses. In: *Fields, B. N. & Howley, P. M. EDS. Virology.* 3 ed., Philadelphia: Lippincott-Raven, Publishers, 1996; p. 1657-1708.

Kapikian AZ, Wyatt RG, Levine MM, Yolken RH, Vankirk DH, Dolin R et al. Oral administration of human rotavirus to volunteers: induction of illness and correlates of resistance. *J Infect Dis.* 1983; 147: 95-106.

Kitamoto N, Ramig RF, Matson DO, Estes MK. Comparative growth of different rotavirus strains in differentiated cells (MA104, HepG2 and CaCo2). *J Virol.* 1991; 184, 729-37.

Knowlton DR, Spector DM, Ward RL. Development of an improved method for measuring neutralizing antibody to rotavirus. *J Virol Meth.* 1991; 33: 127-134.

Leite JPG, Alfieri AA, Woods PA, Glass RI, Gentsch JR. Rotavirus G and P types circulating in Brazil: characterization by RT-PCR, probe hybridization and sequency analysis. *Arch Virol.* 1996; 141: 2365-2374.

Linhares AC & Bresee JS. Rotavirus vaccines and vaccination in Latin América. *Rev Panam Salud Publica.* 2000; 8(5), 305-331.

Linhares AC. Rotavirus infection in Brazil: epidemiology, immunity and potencial vaccination. *Braz J Infect Dis.* 1997; 1: 274-283.

Lourenço MH, Nicolas JC, Cohen J, Scherrer R, Bricout F. Study of human rotavirus genome by eletrophoresis: attempt of classification among strains isolated in France. *Ann Virol Inst Pasteur.* 1981; 132: 161-173.

Martella V, Ciarlet M, Lavazza A, Camarda A, Lorusso E, Terio V et al. Lapine rotaviruses of the genotype P[22] are widespread in Italian rabbitries. *Vet Microbiol.* 2005; 111: 117-124.

Martella V, Ciarlet M, Camarda A, Pratelli A, Tempesta M, Greco G et al. Molecular characterization of the VP4, VP6, VP7, and NSP4 genes of lapine rotaviruses identified in italy: emergence of a novel VP4 genotype. *Virology* 2003; 314: 358-370.

Matthijssens J, Ciarlet M, Rahman M, Attoui H, Bányai K, Estes MK et al. Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. *Arch Virol.* 2008; 153: 1621-1629.

Midthun K & Kapikian Z. Rotavirus vaccines: an overview. *Clin Microbiol Rev.* 1996; 9: 423-434.

MS - Ministério da Saúde. Vigilância epidemiológica ampliada das doenças diarréicas agudas causadas por rotavírus. [acesso em 01 out 2009]. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/rotavirus.pdf>

Nagashima S, Kobayashi N, Ishino M, Alam MM, Ahmed MU, Paul SK et al. Whole genomic characterization of a human rotavirus strain B219 belonging to a novel group of the genus Rotavirus. *J Med Virol.* 2008; 80(11): 2023-33.

Nakagomi T, Correia JB, Nakagomi O, Montenegro FMU, Cuevas LE, Cunliffe NA, Hart CA. Norovirus infection among children with acute gastroenteritis in Recife, Brazil: disease severity is comparable to rotavirus gastroenteritis. *Arch Virol.* 2008; 153: 957-960.

Parashar UD & Cortese MM. Prevention of rotavirus gastroenteritis among infants and children recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR* 2009; 58 (RR02); 1-25.

Parashar, U.D., Gibson, C. J., Bresee, J. S., Glass, R. I. Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerg Infect Dis.* 2006; 12 (2), 304-306.

Parashar UD, Hummelman EG, Bresee JS, Miller MA, Glass RI. Global illness and death caused by rotavirus disease in children. *Emerg Infect Dis.* 2003; 9: 565-572.

Parashar UD, Bresee JS, Gentsh JR, Glass RI. Rotavirus. *Emerg Infect Dis.* 1998; 4: 561-570.

Pereira HG, Azeredo RS, Leite JPG, Candeias JAN, Rácz ML, Linhares AC, et al. Electrophoretic study of the genome of human rotaviruses from Rio de Janeiro, São Paulo and Pará, Brazil. *J Hyg. (London)* 1983; 90: 117-125.

Ramig RF. Systemic rotavirus infection. *Expert Ver Anti Infect Ther.* 2007; 5 (4).

Ramig RF. Pathogenesis of intestinal and systemic rotavirus infection. *J Virol.* 2004; 78(19): 10213-10220.

Ruiz-Palacios GM, Perez-Schael I, Velásquez FR, Abate H, Breue T, Clemens SA, et al. Safety and efficacy of an attenuated vaccine against severe gastroenteritis. *N Engl J Med.* 2006; 354: 11-22.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniats T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory. 1989.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci. (USA)* 1977; 74: 5463-5467.

Santos N, Honma S, Timenetsky MCST, Linhares AC, Ushijima H, Armah GE et al. Development and validation of a microtiter plate hybridization-based PCR-enzyme-linked immunosorbent assay (PCR-ELISA) for identification of clinical relevant human group A rotavirus G and P genotypes. *J Clin Microbiol.* 2008; 12: 1203-1208.

Santos N & Hoshino Y. Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *Rev Med Virol.* 2005; 15 (1): 29-56.

Santos N, Lima RC, Pereira CF, Gouvea V. Detection of rotavirus types G8 and G10 among Brazilian children with diarrhea. *J Clin Microbiol.* 1998; 36(9): 2727-2729.

Schmidt NJ. Cell culture procedures for diagnostic virology. In: Lenette EH, Lennette DA, Lennette ET ed. *Diagnostic procedures for viral, rickettsial, and chlamydial infections.* Washington, American Public Health Association, 1989; p. 51-100.

Simonsen L, Viboud C, Elixhauser A, Taylor RJ, Kapikian AZ. More on Rotashield and intussusception: the role of age at the time of vaccination. *J Infect Dis.* 2005; 192 (1): S36-43.

Smith EM, Estes MK, Graham DY, Gerba CP. A plaque assay for the simian rotavirus SA11. *J Gen Virol.* 1979; 43: 513-519.

Soarez PC, Valentim J, Sartori AMC, Novaes HMD. Cost-effectiveness analysis of routine rotavirus vaccination in Brazil. *Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health.* 2008; 23 (4):221-230.

Timenetsky MCST, Carmona RCC, Morillo SG, Costa FF, Cilli A, Borges DB et al. Surto de diarréia por rotavírus. *BEPA.* 2004. 1 (10).

Timenetsky MCST, Gouvea V, Santos N, Carmona RCC, Hoshino Y. A novel human rotavirus prototype with dual G5-G11 specificity. *J Gen Virol.* 1997; 78: 1373-1378.

Timenetsky MCST, Santos N, Gouvea N. Survey of rotavirus G and P types associated with human gastroenteritis in São Paulo, Brazil, from 1986 to 1992. *J Clin Microbiol.* 1994; 32 (10): 2622-2624.

Thompson JD, Gibson TJ, Plewnick F, Jeanmougin F, Higgins DG. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality tools. *Nucleic Acids Res.* 1997; 24: 4876-4882.

Velázquez FR, Matson DO, Calva JJ, Guerrero L, Morrow AL, Carter-Campbell S et al. Rotavirus infection in infants as protection against subsequent infections. *N Engl J Med.* 1996; 335: 1022-1028.

Vesikari T, Matson DO, Dennehy P, Van Damme P, Santosham M, Rodriguez Z et al. Rotavirus efficacy and safety trial (REST) study team. Safety and efficacy of a pentavalent human-bovine (WC3) reassortant rotavirus vaccine. *N Engl J Med.* 2006; 354: 23-33.

Ward RL, Clemens JD, Sack DA, Knowlton DR, Mcneal MM, Huda N et al. Culture adaptation and characterization of group A rotaviruses causing diarrheal illnesses in Bangladesh from 1985 to 1986. *J Clin Microbiol.* 1991; 29, 1915-23.

Ward RL, Bernstein DI, Shukia R, Young EC, Sherwood JR, McNeal MM et al. Effects of antibody to rotavirus on protection of adults challenged with a human rotavirus. *J Infect Dis.* 1989; 159: 79-88.

Ward RL, Bernstein DI, Young EC, Sherwood JR, Knowlton DR, Schiff GM. Human rotavirus studies in volunteers: determination of infectious dose and serological response to infection. *J Infect Dis.* 1986; 154: 871-880.

WHO – World Health Organization. Guidelines to assure the quality, safety and efficacy of live attenuated rotavirus vaccines (oral). Annex 3. 2005.

Wyatt RG, James HDJ, Pittman AL, Hoshino Y, Greenberg HB, Kalica AR et al. Direct isolation in cell culture of human rotaviruses and their characterization into four serotypes. *J Clin Microbiol.* 1983; 18: 310-317.

Wyatt RG, Greenberg HB, James WD, Pittman AL, Kalica AR, Flores J et al. Definition of human rotaviruses serotypes by plaque reduction assay. *Infect and Immun.* 1982; 110-115.

Wyatt RG, James WD, Bohl EH, Theil KW, Salf LJ, Kalica AR et al. Human rotavirus type 2: cultivation in vitro. *Science* 1980; 207: 189-191.

Xu J, Dennehy P, Keyserling, Westerman LE, Wang Y, Holman RC et al. Serum antibody responses in children with rotavirus diarrhea can serve as proxy for protection. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2005; 12 (2): 273-279.

Yang H, Makeyev EV, Kang Z, Ji S, Bamford DH, Van Dejk AA. Cloning and sequence analysis of dsRNA segments 5, 6 and 7 of a novel non group A, B, C adult rotavirus that caused an outbreak of gastroenteritis in China. *Virus Res.* 2004; 106: 15-26.

Yolken RH, Peterson JA, Vonderfecht SL, Fouts ET, Midthun K, Newburg DS. Human milk mucin inhibits rotavirus replication and prevents experimental gastroenteritis. *J Clin Invest.* 1992; 90:1984-1991.

Zeng CQY, Labbé M, Cohen J, Prasad BVV, Chen D, Ramig RF, Estes MK. Characterization of rotavirus VP2 particles. *Virology* 1994; 201: 55-65.

Zhou Y, Li L, Okitsu S, Maneekarn N, Ushijima H. Distribution of human rotaviruses, especially G9 strains in Japan from 1996 to 2000. *Microbiol Immunol.* 2003; 47 (8): 591-599.

Zhou Y, Supawadee J, Khamwan C, Tonusim S, Peerakome S, Kim B et al. Characterization of human rotavirus serotype G9 isolated in Japan and Thailand from 1995 to 1997. *J Med Virol.* 2001; 65: 619-628.



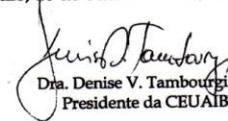
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS  
INSTITUTO BUTANTAN  
Av. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil  
Telefone: (55) (011) 3726-7222 ramal 2106 - Fax: (55) (011) 3726-1505

## CERTIFICADO

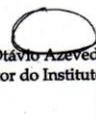
Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação não clínica da vacina pentavalente de rotavírus produzida no Instituto Butantan", protocolo nº 531/08, sob a responsabilidade de Neuza Maria Frazatti Gallina, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 08/10/2008.

Vigência do Projeto:	Nº de animais/espécie
10/2008 - 11/2008	40 / rato - Wistar
	40 / Nova Zelândia - albino

São Paulo, 10 de outubro de 2008.

  
Dra. Denise V. Tambourgi  
Presidente da CEUAIB

De acordo:

  
Dr. Otávio Azevedo Mercadante  
Diretor do Instituto Butantan



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE  
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS  
**INSTITUTO ADOLFO LUTZ**



**Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos - CEPIAL**  
Av. Dr. Arnaldo, 355 - Sala 83 - Cerqueira César - 01246-902  
Fone: 3068-2859

São Paulo, 07 de agosto de 2009.

**Protocolo: 09/2009**

Projeto de Pesquisa nº: CCD-BM 22/07: **PADRONIZAÇÃO E IMPLANTAÇÃO DE TÉCNICAS PARA TITULAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS CEPAS VACINAIS E DA VACINA ANTI-ROTAVIRUS PRODUZIDAS PELO INSTITUTO BUTANTAN.**

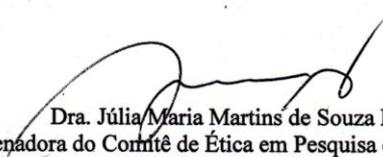
Pesquisador Responsável: **MARIA DO CARMO SAMPAIO TAVARES TIMENETSKY**

Prezado Pesquisador:

O **Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do Instituto Adolfo Lutz – CEPIAL** analisou e deliberou em sua reunião ordinária de **03 de abril de 2009**, em concordância com a Resolução CNS 196/96 e suas resoluções complementares, o projeto acima apresentado e deliberou na condição de **APROVADO**.

Cabe lembrar que em conformidade à Resolução 196/96 são deveres de(a) pesquisador(a):a) comunicar de imediato, qualquer alteração do projeto e só prosseguir com essa alteração, depois da manifestação do CEPIAL; b) manter sob sua guarda e em local seguro, pelo prazo de 5 anos, os dados da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEPIAL, no caso de eventual auditoria; c) comunicar formalmente a este Comitê, quando do encerramento deste projeto; d) elaborar e apresentar relatórios parciais e finais; e) justificar perante o CEPIAL, a interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Atenciosamente

  
Dra. Júlia Maria Martins de Souza Felippe  
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos  
Instituto Adolfo Lutz - **CEPIAL**



**SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE**  
COORDENAÇÃO DE CONTROLE DE DOENÇAS  
**INSTITUTO ADOLFO LUTZ**  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
CEPIAL

São Paulo, 23 de dezembro de 2006.

Ilmo. (a) Sr.(a): **MARIA DO CARMO SAMPAIO TIMENETSKY**

Coordenador (a) do Projeto de Pesquisa: **AVALIAÇÃO DA VACINA CONTRA ROTAVÍRUS DESENVOLVIDA PELO INSTITUTO BUTANTÁ. Fase I: AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA, TOLERABILIDADE E IMUNOGENICIDADE.**

O Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz (CEPIAL), em reunião ordinária do mês DEZEMBRO, apresentou o PARECER, enquadrando o referido projeto na categoria *APROVADO (atenção sobre o TECLE muito longo e prolixo, que merece revisão para facilitar o entendimento pelo o voluntário)*, de acordo com a Resolução 196/96 sobre Pesquisas Envolvendo Seres Humanos / CNS / MS, Brasília, 1996.

Atenciosamente



Dra. Júlia Maria Martins de Souza Felipe  
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa  
Instituto Adolfo Lutz  
CEPIAL