



# Ficou fácil separar o joio do trigo



## Metodologia inovadora leva apenas 24 horas para diferenciar amostras selvagem e vacinal de rotavírus A

Cristiane Albuquerque



combate ao rotavírus no Brasil conta, desde março de 2006, com um importante aliado: a vacinação gratuita, incluída no calendário nacional de imunizações. A vacinação, no entanto, coloca um desafio para os cientistas: o rotavírus tipo A – o maior responsável por casos de gastroenterite infantil aguda em todo o mundo – pode apresentar uma série de pequenas variações genéticas, compondo um conjunto de diferentes genótipos. Por isso, eventualmente, mesmo uma criança vacinada poderá ser infectada e apresentar um quadro menos grave de gastroenterite aguda. Quando a criança é infectada pelo genótipo G1P[8] – o mesmo utilizado na produção da vacina Rotarix®, adotada no Brasil –, como, então, diferenciar se a amostra clínica da criança contém vírus vacinal ou selvagem?

Na busca de uma resposta para esta pergunta, os pesquisadores do Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz), que atua como referência em rotaviruses junto ao Ministério da Saúde, estudou quais seriam as técnicas mais adequadas para uma diferenciação segura. O resultado é um método inovador, eficaz, altamente específico e que pode ser executado em apenas 24 horas, o que é indispensável na investigação de casos de crianças vacinadas que foram novamente infectadas pelo rotavírus A.

### Rotavírus e vacinação

Os rotavírus A estão associados às gastroenterites agudas e são responsáveis pela morte de aproximadamente 511 mil crianças menores de 5 anos, anualmente, sobretudo nos países em desenvolvimento. Transmitidos principalmente por via

oro-fecal, por água, alimentos e superfícies contaminadas e pelo contato direto com pessoas infectadas, provocam um quadro de diarreia, vômito e febre branda nos pacientes.

A vacinação é a estratégia de controle mais eficaz contra o rotavírus, pois reduz a forma grave da doença. Para gerar imunidade, a vacina inclui em sua formulação partículas virais atenuadas. No Brasil, a vacina adotada pelo Ministério da Saúde é a monovalente (G1P[8] / Rotarix®).

### Análise do genoma viral

O Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental do IOC propõe uma nova abordagem para realizar a diferenciação entre os vírus vacinal e selvagem. “Atualmente, temos crianças que foram imunizadas com doses da vacina e que, depois, foram infectadas com rotavírus A. Então, a principal questão proposta pelo estudo é, em uma determinada amostra, primeiramente, verificar se existe a presença do genótipo G1P[8] do rotavírus A e, em segundo lugar, analisar se este genótipo é de origem selvagem ou vacinal”, explica José Paulo Leite, chefe do Laboratório e coordenador da pesquisa.

No estudo, os pesquisadores analisaram o genoma viral (chamado dsRNA, um RNA de dupla fita, contendo 11 segmentos) em amostras de três diferentes lotes da vacina Rotarix®. A partir das amostras, foram sequenciados 10 dos 11 genes do rotavírus A que codificam proteínas estruturais (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 e VP7) e não estruturais (NSP1, NSP3, NSP4 e NSP5). Os genes foram multiplicados por técnicas de amplificação genômica (RT-PCR).

“Comparamos as sequências que conseguimos obter com as de todos os genótipos de rotavírus A disponíveis no banco de dados internacional GenBank”, conta o pesquisador. De acordo com os resultados, o gene que codifica a proteína não estrutural NSP3 se mostrou o mais adequado para a diferenciação entre os genótipos G1 de origem vacinal e selvagem.

“Atualmente, preconiza-se o uso do gene que codifica a NSP3 para o diagnóstico de rotavírus A pela metodologia de amplificação genômica quantitativa. Observamos que, pelo fato de ter uma mutação única, este gene se enquadraria em nossa proposta, que consistia em obter um método fácil e relativamente rápido para a distinção entre as amostras vacinal e selvagem dos rotavírus A com genótipo G1”, lembra Tatiana Rose, pesquisadora visitante do Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental do IOC. A metodologia proposta tem como base a amplificação parcial do gene que codifica a proteína NSP3, seguida de análise com uma enzima (endonuclease de restrição BspHI).

### Vantagens

Um grupo holandês já havia demonstrado a diferença entre amostras selvagem e vacinal do rotavírus A com base na análise do gene VP7. No entanto, essa metodologia tem um custo mais elevado e demora, em média, 48 horas para ser concluída.

“A técnica que desenvolvemos apresenta como principais vantagens o menor risco de reação cruzada e o menor custo em comparação a outros métodos publicados”, compara Leite. “A técnica que utilizamos é também mais rápida e sensível para distinguir entre o gene NSP3 da vacina Rotarix® e o da amostra selvagem do rotavírus A. Com o nosso método, em apenas 24 horas é possível saber se a amostra é vacinal ou selvagem”, ressalta Tatiana.

De acordo com os pesquisadores, o trabalho terá efeitos importantes na saúde pública, especialmente no Brasil, na América Latina e nos países que adotaram a vacina Rotarix®, pois o monitoramento dos genótipos circulantes do rotavírus A e a diferenciação entre amostras são cruciais. “Teremos, assim, a possibilidade de avaliar o impacto do esquema vacinal na prevalência dos genótipos mais comuns, no surgimento de genótipos que ‘escapam’ da imunização e, ainda, no estudo da evolução dos rotavírus A”, justifica Leite. 