



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS TROPICAIS**

**ALESSILVA DO SOCORRO LIMA DE OLIVEIRA**

**AVALIAÇÃO TEMPORAL E GENÉTICA DO ROTAVÍRUS GENÓTIPO G2  
CIRCULANTE NA REGIÃO NORTE DO BRASIL ANTES E APÓS A  
INTRODUÇÃO DA VACINA CONTRA ROTAVÍRUS**

**BELÉM-PA**

**2016**

**ALESSILVA DO SOCORRO LIMA DE OLIVEIRA**

**AVALIAÇÃO TEMPORAL E GENÉTICA DO ROTAVÍRUS GENÓTIPO G2  
CIRCULANTE NA REGIÃO NORTE DO BRASIL ANTES E APÓS A  
INTRODUÇÃO DA VACINA CONTRA ROTAVÍRUS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará como requisito para obtenção do grau de Doutor em Patologia das Doenças Tropicais.

Orientadora: Joana D'Arc Pereira Mascarenhas

BELÉM-PA

2016

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**Biblioteca do Instituto Evandro Chagas**

---

Oliveira, Alessilva do Socorro Lima de.

Avaliação temporal e genética do rotavírus genótipo G2 circulante na região norte do Brasil antes e após a introdução da vacina contra o rotavírus. / Alessilva do Socorro Lima de Oliveira. – Belém, 2016.

111 f.: il.; 30 cm.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dra. Joana D'Arc Pereira Mascarenhas

Tese (Doutorado em Doenças Tropicais) – Universidade Federal do Pará, Núcleo de Medicina Tropical, 2016.

1. Rotavírus. 2. Genótipo G2. 3. Diarreia. 4. Vacina. I. Mascarenhas, Joana D'Arc Pereira, *orient.* II. Universidade Federal do Pará. III. Título.

CDD: 616.3427

---

Alessilva do Socorro Lima de Oliveira

**AVALIAÇÃO TEMPORAL E GENÉTICA DO ROTAVÍRUS GENÓTIPO G2  
CIRCULANTE NA REGIÃO NORTE DO BRASIL ANTES E APÓS A  
INTRODUÇÃO DA VACINA CONTRA ROTAVÍRUS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará como requisito para obtenção do grau de Doutor em Patologia das Doenças Tropicais.

Aprovado em: 31/ 10/ 2016

Banca Examinadora

---

Prof. Dra. Joana D'Arc Pereira Mascarenhas

Orientadora

---

Prof. Dra Maísa Silva de Sousa, UFPA

Membro da Banca

---

Prof. Dra Ana Cecília, IEC

Avaliadora

---

Prof. Dr. Diego Assis das Graças, UFPA

Avaliadora

---

Prof. Dra Rita Catarina Medeiros, , NMT

Avaliadora

---

Prof. Dr Hugo Reis Resque, IEC

Suplente

Dedico este trabalho a minha família,  
principalmente ao meu irmão Adilson  
Oliveira, que mesmo em sua ausência se  
faz tão presente em minha vida.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a DEUS, não por uma simples demagogia, mais por saber que foi o seu infinito amor que me acompanhou quando achei que estava só, foi sua mão que me sustentou e deu forças para prosseguir.

Agradeço ainda a família maravilhosa que tenho e aos amigos que me ajudaram consideravelmente em toda essa caminhada.

Agradeço em especial a minha mãe, sem a qual nenhum sonho teria sido realizado.

A Dra. Joana Mascarenhas, por me acolher em seu laboratório e me orientar neste trabalho, por toda sua dedicação, atenção e paciência.

Ao Instituto Evandro Chagas na pessoa de seu diretor Dr. Pedro Fernando da Costa Vasconcelos.

A seção de Virologia do IEC, representada pelo seu chefe Dr. Alexandre da Costa Linhares.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte deste trabalho.

A toda equipe do Laboratório de Rotavírus do Instituto Evandro Chagas, Sylvia Guerra, Luana Soares, Euzeni Menezes, Ian Carlos, Patrícia Lobo, Yvone Gabbay, Josué Souza que direta ou indiretamente ajudaram na realização deste trabalho;

Aos meus amigos Sylvia Guerra, Ian Carlos, Patrícia Lobo, Luana Soares, Caroline Menezes, Mauro Marques pelo estímulo que sempre me deram para a concretização deste trabalho.

Aos meus amigos que sempre entenderam meus estresses e ausência durante este tempo e me deram um enorme e importante apoio.

Aos meus familiares, que mesmo longe, sempre estiveram ao meu lado.

E a todos que de alguma forma, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

"Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível."

Charles Chaplin

## RESUMO

O rotavírus do grupo A (RVA) é a causa mais importante de diarreia, sendo responsável por cerca de 40% da morbidade e mortalidade relacionada a esta doença em crianças de todo o mundo antes da introdução da vacina. Após a introdução da vacina contra o RVA no Brasil no ano de 2006 o genótipo G2 de RVA ressurgiu, sendo detectado em até 82% das crianças menores de cinco anos de idade em estudos realizados pós vacinação, levando a questionamentos quanto à proteção conferida pela vacina frente ao tipo G2, bem como a ocorrência de uma pressão seletiva da vacina. Pouco se conhece sobre a evolução e a diversidade do genótipo G2 e a possível influência da vacina sobre este. Para proporcionar um maior conhecimento sobre a circulação e diversidade genética dos RVA genótipo G2, realizamos a análise temporal da circulação deste genótipo ao longo de 31 anos e a análise dos genes estruturais e não estruturais de amostras que circularam ao longo de 20 anos na região norte do Brasil. A avaliação temporal da circulação de diferentes genótipo que circularam nesta região permitiu observar que o tipo G2 de RVA apresentou ao longo desses anos um padrão cíclico de ocorrência que o fez emergir em um cenário de pós implantação da vacina, sugerindo uma flutuação natural devido a variações naturais ocorridas ao longo do tempo. Análises filogenéticas mostraram que para as linhagens de VP7 G2 existe uma contínua evolução, responsável por uma rotatividade na circulação de linhagens, sendo detectada duas linhagens e três sublinhagens ao longo de 20 anos. Três substituições importantes nas regiões antigênicas de VP7 (A87T, D96N e S213D) foram identificadas em amostras que circularam a partir dos anos 90. Estas modificações podem ter aumentado a capacidade das cepas de circular em ambientes onde há cobertura vacinal para RVA. Todas as cepas G2P[4] para as quais foram analisados os 11 segmentos gênicos apresentaram uma constelação gênica *DS-1-like*: I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2, apesar de que diversas variantes virais circularam no período estudado. Não foram observadas diferenças nos sítios antigênicos das proteínas VP8\* e VP7 entre amostras que circularam no período anterior e posterior à introdução da vacina. Para os genes VP2 e VP3 foi evidenciado em algumas amostras uma forte correlação com genes de origem animal. Este estudo fornece evidências da diversidade genética existente no genótipo G2 de RVA, sugerindo que este tipo apresenta características naturais de flutuação e que sua emergência após o período de implantação da vacina está mais diretamente associado a características ecológicas do vírus do que a uma pressão vacinal.

Palavras chaves: Rotavírus, genótipo G2, diarreia, vacina



## ABSTRACT

Rotavirus group A (RVA) is the most important cause of diarrhea, accounting for about 40% of morbidity and mortality related to this disease in children around the world before the introduction of the vaccine. After the introduction of the vaccine against the RVA in Brazil in 2006 genotype G2RVA he rose again, being detected in up to 82% of children under five years of age performed post vaccination studies, leading to questions about the protection afforded by the vaccine facing the G2 type, as well as the occurrence of a selective pressure vaccine. Little is known about the evolution and diversity of G2 genotype and the possible influence of the vaccine on this. To provide a better understanding of the flow and genetic diversity of RVA genotype G2, we perform the time of circulation analysis of genotype over 31 years and analysis of structural and non-structural genes from samples that have circulated over 20 years in northern region of Brazil. The temporal assessment of movement of different genotype circulating in this region has observed that the G2 type RVA presented over the years a cyclical pattern of occurrence that did emerge in a post deployment of the vaccine scenario, suggesting a natural fluctuation due to variations natural occurring over time. Phylogenetic analyzes showed that for VP7 lines G2 there is a continuous, responsible for a movement of rotation in the lines being detected two lines and three sublineages over 20 years. Three important substitutions in antigenic regions of VP7 (A87T, D96N and S213D) were identified in samples that circulated from the 90. These changes may have increased the capacity of the circulating strains in environments where there is vaccine coverage for RVA. All G2P[4] strains analyzed revealed a DS-1-like genome constellation: I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2. However, several viral variants circulated during the study period. No differences were observed in the antigenic sites of the VP8 \* and VP7 proteins between samples that circulated in the period before and after the introduction of the vaccine. For VP2 and VP3 genes was evident in some samples a strong correlation with animal genes. This study provides evidence of genetic diversity in G2 genotype RVA, suggesting that this type has natural characteristics fluctuation and its emergence after the implementation period of the vaccine is more directly associated with ecological characteristics of the virus than a vaccine pressure.

## SUMÁRIO

	<b>LISTA De FIGURAS</b>	11
	<b>LISTA DE SIMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS</b>	12
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	13
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b>	15
2.1	HISTÓRICO	15
2.2	PARTÍCULA VIRAL	16
2.3	PROPRIEDADE FÍSICO-QUÍMICA DOS RVS	17
2.4	TAXONOMIA E CLASSIFICAÇÃO VIRAL	18
2.5	ORGANIZAÇÃO DO GENOMA	19
2.6	MECANISMO DE EVOLUÇÃO DOS ROTAVÍRUS	21
2.7	PROTEÍNAS ESTRUTURAIS	22
2.8	PROTEÍNAS NÃO ESTRUTURAIS	26
2.9	EPIDEMIOLOGIA DOS RVA CIRCULANTES	30
2.10	EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DO ROTAVÍRUS GENÓTIPO G2	34
2.11	REPLICAÇÃO VIRAL	36
2.12	FISIOPATOLOGIA	38
2.13	QUADRO CLÍNICO	41
2.14	IMUNIDADE	42
2.15	TRANSMISSÃO	44
2.16	TRATAMENTO	45
2.17	DIAGNÓSTICO LABORATORIAL	46
2.18	IMUNIZANTES CONTRA ROTAVÍRUS	48
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b>	53
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS</b>	54
4.1	OBJETIVO GERAL	54
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	54
<b>5</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	55
5.1	ASPECTOS ÉTICOS E DE BIOSSEGURANÇA	55
5.2	POPULAÇÃO DO ESTUDO	55
5.3	MÉTODOS	56
<b>6</b>	<b>RESULTADOS</b>	57
6.1	ARTIGO 1: Distribuição de sorotipos de RVA na região Norte do Brasil ao longo de 27 anos, no período pré e pós vacina.	57
6.2	ARTIGO 2 : Molecular Analysis of structural genes of the G2 rotavirus circulating for 20 years in the Amazon region of Brazil.	64
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	86
7.1	Distribuição de sorotipos de Rotavírus circulantes na região Norte no período pré e pós vacina	86
7.2	Análise molecular de Rotavírus G2 no período pré e pós vacina	87
<b>8</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	91
<b>9</b>	<b>REFERÊNCIAS</b>	92

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1: Partículas de rotavírus semelhante ao formato de “roda” quando visualizadas por ME.	15
Figura 2: Representação esquemática da partícula viral do RV mostrando as principais estruturas e proteínas virais.	16
Figura 3- Estrutura de um segmento genômico do RNAfd de rotavírus do grupo A.	21
Figura 4- Subunidade proteica de VP6.	24
Figura 5- Estruturas de NSP2 (C-E) e seus complexos com a NSP5 e RNA (F-G).	27
Figura 6: Homodímero do domínio de ligação do terminal N de NSP3.	28
Figura 7- Representação esquemática da NSP4 de RV: Detalhes de sua localização na membrana do retículo endoplasmático.	29
Figura 8: Distribuição geográfica das amostras de RV humanos de grupo A detectadas entre 2007 e 2012.	32
Figura 9: Localização geográfica dos genótipos de RVA detectados no Brasil no período de 2005 a 2009.	33
Figura 10: Replicação dos RV.	37
Figura 11: mecanismos de patogênese do RV.	40
Figura 12: Resposta celular inata á infecções por RV.	43
Figura 13: Países que introduziram a vacina contra rotavírus no programa de imunização nacional.	51

**LISTA DE SIMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS**

Å- Angstrom

Aa- Aminoácido

dsRNA- RNA de fita dupla

EGPA – Eletroforese vertical em gel de poliacrilamida

EIE- Ensaio imuno enzimático

g/cm<sup>3</sup> - Gramas por centímetro cúbico

GTP- guanosina trifosfato

IFN- interferon

IgA- Immunoglobulina A

IgG- Immunoglobulina G

IL- interleucina

kDa- Quilodáltons

MAbs- anticorpos monoclonais

ME- Microscopia eletrônica

µL – Microlitro

NSPs – Do inglês: *Non structural proteins* – Proteínas não-estruturais

NTPase - Do inglês: *Nucleoside triphosphatase*

nm – Nanômetro

Nt – Nucleotídeo

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

RE-retículo endoplasmático

RER- retículo endoplasmático rugoso

RNAfd- RNA de fita dupla

RPM – Rotações por minuto

RV- Rotavírus

RVA- Rotavírus do Grupo A

SGs- subgrupos

VPs – Do inglês: *Viral structural proteins* - Proteínas estruturais

VR- Região de variação

TRO- Terapia de reidratação oral

## 1 INTRODUÇÃO

A doença diarreica é a quarta principal causa de morbidade e mortalidade entre crianças menores de cinco anos de idade em todo o mundo sendo que no ano de 2013 foi responsável por 578 mil mortes de crianças nessa faixa etária (LIU et al., 2015). Os rotavírus do grupo A (RVA) são a causa mais importante de diarreia, sendo responsável por cerca de 40% da morbidade e mortalidade relacionada à doença diarreica em crianças de todo o mundo antes da introdução da vacina (TATE et al., 2012). Na União Europeia, estima-se que 3,6 milhões de episódios de gastroenterite por RV ocorrem anualmente (DONÀ et al., 2016).

Na América Latina e Caribe, os RVA causam anualmente cerca de 10 milhões de casos diarreicos, 2 milhões de visitas hospitalares, 75.000 hospitalizações e 15.000 mortes (de OLIVEIRA et al., 2008). No Brasil, estima-se que os RVA causem 3.352.053 episódios de diarreia, 655.853 visitas para cuidados de saúde, 92.4535 hospitalizações e 850 mortes de crianças menores de cinco anos de idade. As infecções por RVA atingem quase todas as crianças com até cinco anos de idade, independentemente da condição socioeconômica e do país de origem (SOÁREZ et al., 2008).

A gastroenterite causada por RVA tende a ser mais grave do que aquela causada por outros patógenos virais. A tríade de sintomas, caracterizada por febre, diarreia e vômito pode levar à desidratação de forma rápida. O vômito tende a impedir o uso da reidratação oral nos casos mais graves (BAHL et al., 2005). Este fato explica a elevada mortalidade por RVA em áreas onde o acesso à assistência médica é deficiente (ROSE et al., 2009).

Com a introdução de vacinas contra RVA é esperado um declínio significativo das mortes por diarreia entre crianças, fato este que já é observado no México e Estados Unidos (CORTESE et al., 2010; RICHARDSON et al., 2010). Estima-se que a vacinação contra RVA evite 228.000 mortes anualmente em todo mundo (RHEINGANS et al., 2009). Até o momento dezesseis países da América Latina e Caribe introduziram a vacinação contra RVA em seus calendários de vacinação (OLIVEIRA et al., 2015). No Brasil, a vacina foi introduzida em março de 2006 e estudos mostram uma redução de até 43,8% na incidência de episódios de diarreia por rotavírus. Observou-se ainda uma predominância de G2P[4] como o principal genótipo identificado no período pós-vacina (MONTENEGRO et al., 2015). Estudo realizado no

Brasil, na região do Triângulo Mineiro demonstra uma redução acentuada nos casos de RVA, no período de 2011 a 2012, sugerindo um impacto positivo do programa de vacinação (DULGHEROFF et al., 2014).

Após a introdução da vacina contra o rotavírus no Brasil muitos estudos detectaram uma elevação acentuada na ocorrência da cepa G2P[4], fato este que levou muitos autores a sugerir que este fato era decorrente de uma pressão seletiva ocasionada pela introdução da vacina (GURGEL et al., 2008; LEITE et al., 2008; NAKAGOMI et al., 2008; VAN DOORN et al., 2009; CARVALHO-COSTA et al., 2011; LINHARES et al., 2011; DULGHEROFF et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2012). Provavelmente o curto período avaliado por esses estudos, pode ter detectado uma flutuação natural deste genótipo ao longo do tempo e não uma ocorrência influenciada pela introdução da vacina (GUERRA et al., 2015).

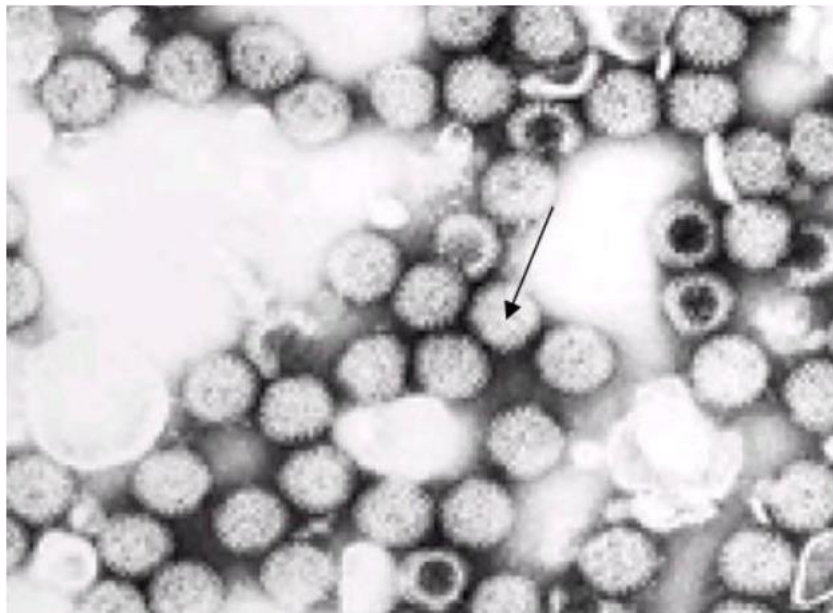
## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 HISTÓRICO

Os RV foram descritos pela primeira vez em 1963, quando se observavam, à microscopia eletrônica, amostras fecais de macacos e camundongos. Somente dez anos depois, em 1973, Bishop e colaboradores identificaram por microscopia eletrônica, do epitélio duodenal de crianças com diarreia aguda, um vírus com característica estrutural esférica semelhante a uma roda, medindo 70 nm de diâmetro (EBRAHIM, 2008). Inicialmente receberam a denominação de Duovírus, mais devido ao seu aspecto radiado, esses agentes foram designados, posteriormente de rotavírus (figura 1).

Em pouco tempo após sua primeira detecção, os RV foram reconhecidos mundialmente como a mais frequente causa de gastroenterite em crianças menores de cinco anos de idade.

No Brasil foram detectados pela primeira vez por Linhares et al. (1977), nas fezes de crianças atendidas em um hospital público de Belém, Pará.



**Figura 1:** Partículas de rotavírus semelhante ao formato de “roda” quando visualizadas por ME. (Adaptada de Kapikian, Hoshino, Chanock, 2001).

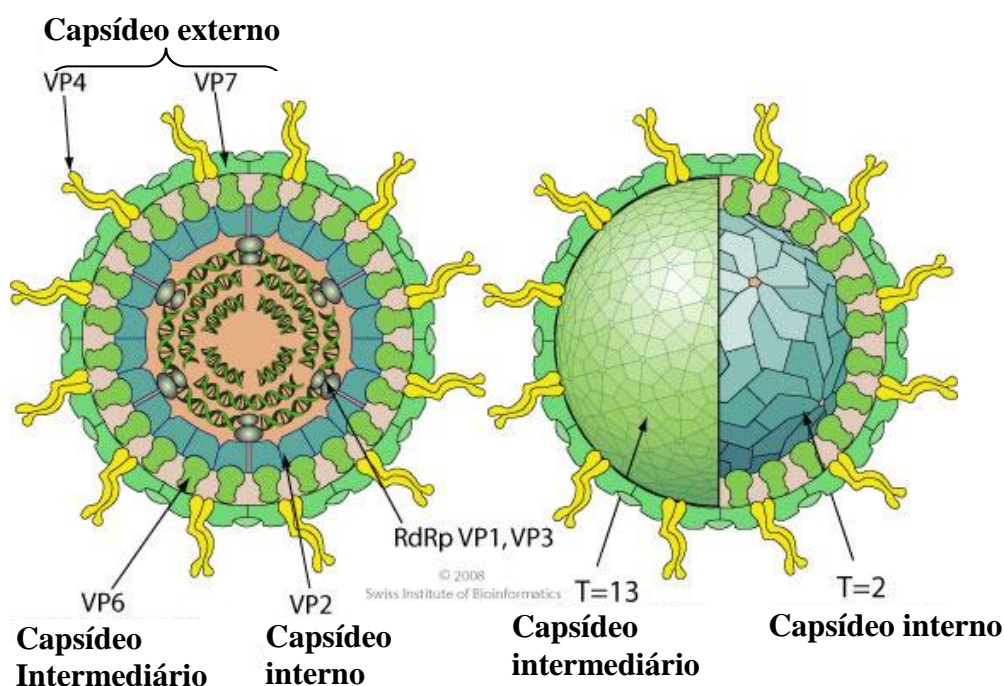
A descoberta do rotavírus revolucionou o conhecimento microbiológico das doenças diarreicas infantis (KAPIKIAN et al., 1993, 2001). Até então, aceitava-se que a maioria dos episódios de gastroenterite aguda na infância era de natureza infecciosa,

causada por vírus, bactérias ou parasitas, mas a etiologia ficava por esclarecer em mais de 50-60% dos casos.

Devido a sua relevância na etiologia da diarreia aguda e associação com altos índices de mortalidade infantil, vários estudos foram conduzidos em nível mundial, buscando o conhecimento do RV e da doença associada, para assim evitar a perda de milhares de vidas em todo o mundo (CUNLIFFE et al., 1998; KOSHIMURA et al., 2000; LINHARES e BRESER, 2000; CARNEIRO et al., 2005; LUZ et al., 2005; SANTOS, HOSHINO, 2005).

## 2.2 PARTÍCULA VIRAL

Os RV pertencem à família *Reoviridae*, gênero *Rotavírus*. Sua partícula viral não possui envelope lipoproteico (Figura 2), mede cerca de 70-90 nm de diâmetro, é dotada de nucleocapsídeo sendo constituída por três camadas proteicas concêntricas e pelo genoma viral com aproximadamente 18.500 pares de base (pb) divididos em 11 segmentos de RNA de fita dupla (dsRNA) de polaridade positiva. Cada segmento genômico codifica uma proteína, com exceção do último, que codifica duas, totalizando 12 proteínas (Quadro 1), sendo seis estruturais (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 e VP7) e seis, não estruturais (NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 e NSP6) (ESTES et al., 2007).





**Figura 2:** Representação esquemática da partícula viral do RV mostrando as principais estruturas e proteínas virais (Fonte: Retirado e adaptado de [expasy.org/viralzone/complete\\_by\\_species/107.html](http://expasy.org/viralzone/complete_by_species/107.html)).

**Quadro 1 :** Funções atribuídas às proteínas codificadas pelos segmentos genômicos de RV do grupo A

Gene	Proteína	Tamanho Pb	Localização nas partículas	Funções
1	VP1	3.302	Nucleocapsídeo	RNA polimerase RNA dependente
2	VP2	2.690	Nucleocapsídeo	União do RNA/ formação do nucleocapsídeo
3	VP3	2.591	Nucleocapsídeo	Guanililtransferase/Metiltransferase/Proteína básica
4	VP4	2.362	Capsídeo externo	Proteína de união à célula/ interage com VP6. Infectividade viral aumenta após clivagem pela tripsina formando VP5* e VP8*. Designa o genótipo P
5	NSP1	1.581	Proteína não estrutural	Associa-se ao citoesqueleto/ interage com fator 3 regulatório de IFN
6	VP6	1.356	Capsídeo intermediário	Proteína estrutural de capsídeo intermediário/ Antígeno de subgrupo
7	NSP3	1.104	Proteína não estrutural	Envolvida na regulação da tradução
8	NSP2	1.059	Proteína não estrutural	Acumula-se em viroplasmas/atividade NTPase/ liga NSP5 e VP1
9	VP7	1.062	Capsídeo externo	Glicoproteína estrutural do capsídeo externo/ antígenos neutralizantes tipos G
10	NSP4	751	Proteína não estrutural	Enterotoxina/receptor para partícula com duplo capsídeo no RE
11	NSP5	667	Proteína não estrutural	Possível cinase autocatalítica/Interage com VP2, NSP2 e NSP6
	NSP6		Proteína não estrutural	Produto de ORF2 do gene 11/ interage com NSP5/localizada em viroplasmas

Fonte: Retirado e adaptado de Estes, Kapikian (2013)

As partículas de RV apresentam atividade de RNA-polimerase dependente. Essas partículas virais quando purificadas, possuem gradientes de sedimentação distintos, com densidades de 1,44 g/cm<sup>3</sup> para partículas com capsídeo simples, 1,38 g/cm<sup>3</sup> para partículas com capsídeo duplo e 1,36 g/cm<sup>3</sup> para aquelas com capsídeo triplo (BICAN et al., 1982).

Na estrutura dos RV, três tipos de canais podem ser diferenciados com base em sua posição e tamanho, sendo 12 tipos I, 60 II e 60 III. Estes canais estão envolvidos na importação de metabólitos requeridos para a transcrição do RNA e exportação do transcrito nascente de RNA para subsequente processo de replicação viral (PESAVENTO et al., 2003; Estes e Kapikian, 2007).

### 2.3 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DOS RVS

As propriedades químicas do RV foram estudadas em cepas animais, com muitos resultados sendo confirmados nas cepas de origem humana. O vírus é resistente

no meio ambiente, sobrevivendo por longos períodos, mesmo sob condições adversas. Persiste de forma viável em superfícies porosas e não porosas. Nesses locais, permanece ativo com variações acentuadas de pH (pH entre 3 e 9) e de temperatura (CARTER et al. 2005). Apresenta resistência ao tratamento com éter e clorofórmio, sendo mais adequado para a sua inativação, desinfetantes naturais como os fenóis e a formalina. De entre estes, o álcool a 95% parece ser a forma mais eficaz de inativação viral (ESTES, 2001).

## 2.4 TAXONOMIA E CLASSIFICAÇÃO VIRAL

Os RV constituem o gênero *Rotavírus* um dos 15 gêneros da família Reoviridae, que compreendem vírus que só infectam vertebrados (aves e mamíferos). Apresentam três especificidades antigênicas, quais sejam, grupo, subgrupo e genótipo. De acordo com a reatividade sorológica e variabilidade genética da proteína VP6, o gênero *Rotavírus* inclui oito grupos (RVA-RVH) diferentes, também denominado espécies (MATTHIJNSSENS et al., 2011). Recentemente, um novo rotavírus foi descrito em cães, sendo classificado no grupo I(RVI) (MIHALOV-KOVÁCS et al., 2015).

Os rotavírus do grupo A, RVB, RVC RVD são associados a gastroenterite em humanos e animais, sendo que o RVA é o mais importante em associação com gastroenterites em seres humanos (HOSHINO et al., 1994; MARTINEZ-LAZO et al., 2008; MATTHIJNSSENS et al., 2008). O Grupo B de rotavírus foi detectado em seres humanos, bovinos, ovinos, porcos e ratos. O Grupo C rotavírus infecta porcos, seres humanos, bovinos, cães e furões (ESTES et al., 2007). O RVH foi detectado pela primeira vez em seres humanos, na China e Bangladesh; mais recentemente, em suínos no Japão e Brasil (NAGASHIMA et al., 2008; MOLINARI et al., 2014). O RV D, RVE, RVF e RVG só foram detectados em animais (ESTES et al., 2007; MATTHIJNSSENS et al., 2011), RVD, RVF e RVG afetam exclusivamente aves (ESTES et al., 2007; JOHNE et al., 2011). Grupo E rotavírus foi detectada apenas em suínos (MARTELLA et al 2010; STEELE et al., 2004).

Os RVA apresentam quatro subgrupos (SGs) denominados de I, II, I+II e não I/não II os quais são definidos de acordo com a reatividade frente a dois anticorpos monoclonais (MAbs) (DESSELBERGER, 1996; CIARLET et al., 2002; LEITE et al., 2008; MATTHIJNSSENS et al., 2008). O SG II, é o mais comum entre seres humanos.

Entretanto, com base em determinação molecular foram diferenciados dentro dos RVA humanos dois genogrupos, o I que recebeu o genogrupo II: SG II, SG I+II e SG não I/não II (ITURRIZA-GÓMARA et al., 2002).

Os sorotipos/genótipos definem uma classificação binária designada pelos genes que codificam para as proteínas VP4 e VP7. Os sorotipos são determinados por anticorpos monoclonais específicos e testes de neutralização, enquanto que os genótipos são caracterizados por métodos de biologia molecular. Até o momento, foram detectados 32 genótipos/sorotipos G e 46 diferentes genótipos P, com 14 sorotipos P (ESTES, GREENBERG, 2013; ABE et al., 2009; URSU et al., 2009; MATTHIJNSSENS et al. 2011; Rotavírus Classification Working Group, 2013; OKADERA et al., 2016; FUJII et al., 2016).

Uma nova classificação baseada em todos os genes de RV foi proposta por Matthijnsens et al. (2008). Esta nova classificação reúne as características moleculares dos genes que codificam para as proteínas: VP7-VP4-VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5/6, tais sendo Gx-P[x]-Ix-Rx-Cx-Mx-Ax-Nx-Tx-Ex-Hx, respectivamente. Essa nova metodologia de classificação permitirá um maior conhecimento dos genótipos circulantes, seus eventos de reestruturações genéticas (*reassortment*), sua variabilidade de mutação entre os segmentos genômicos e a detecção mais precisa do surgimento de novos genótipos e de variantes genóticas.

Até o momento, com base nos 11 genes que codificam para as 12 proteínas, foram caracterizados 32 genótipos G (Glicoproteína - VP7), 46 genótipos P (sensível a protease- P), 24 I (Capsídeo Interno- VP6), 18 R (RNA polimerase-RNA dependente - VP1), 17 C ( Proteína do Core - VP2), 17 M ( Metiltransferase- VP3), 28 A (Antagonista do Interferon- NSP1), 17 N (NTPase - NSP2), 19 T (Intensificador de Tradução- NSP3), 24 E (Enterotoxina - NSP4), e 19 H (Fosfoproteína- NSP5) (MATTHIJNSSENS et al., 2011; TROJNAR et al., 2013; ROTAVIRUS CLASSIFICATION WORKING GROUP (RCWG), 2015); LI et al., 2016).

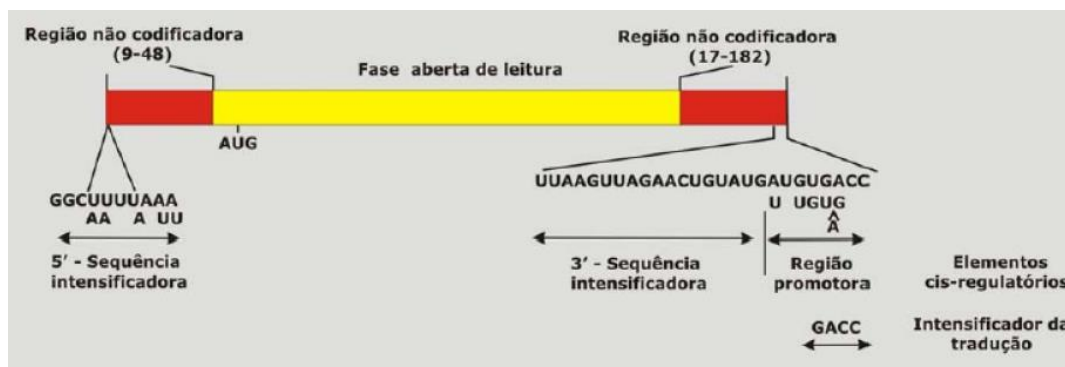
## 2.5 ORGANIZAÇÃO DO GENOMA

O conhecimento da organização estrutural do genoma dos RV assume uma grande importância devido ao íntimo envolvimento do genoma viral com várias atividades enzimáticas que ocorrem dentro do capsídeo (JAYARAM et al., 2004).

As partículas virais possuem a sua própria RNA-polimerase, dependente de RNA, a fim de transcrever cada segmento de RNA em RNAs mensageiros. Cada segmento de RNA, no sentido 5', inicia com uma guanidina, seguindo-se um conjunto de sequências conservadas que são parte da região não codificadora 5'. Segue uma fase aberta de leitura (ORF, *Open Reading Frame*), a qual codifica uma proteína que finaliza o códon de terminação, seguida por um conjunto de sequências não codificadoras (Figura 3) (ESTES, GREENBERG, 2013).

Quase todos os RNAs mensageiros terminam com uma sequência consenso 5'-UGUGACC-3', sendo que estas desencadeiam sinais importantes para a expressão gênica e replicação (WENTZ et al., 1996). Os tamanhos das regiões não codificadoras nas extremidades 5' e 3', são variáveis para os diferentes genes e todos os genes sequenciados possuem pelo menos uma ORF longa depois do primeiro códon de iniciação (ESTES, GREENBERG, 2013). A expressiva conservação das sequências terminais nos segmentos genômicos sugere que elas contêm importantes sinais para a transcrição, transporte de RNA, replicação, montagem ou empacotamento dos segmentos genômicos (PATTON, SPENCER, 2000).

Análises por crioeletromicrografia do RV detectaram uma notável habilidade do genoma dos RV de submeter-se à condensação e expansão reversível dentro do interior do capsídeo (PENSAVENTO et al., 2001; JAYARAM et al., 2004). Esses estudos forneceram informações adicionais na organização estrutural do genoma e natureza das interações entre este e as proteínas internas. Na presença de pH elevado com íons de amônio, o genoma, que possui um raio original de 220Å, sofre condensação a um raio de 180Å, e quando trazido ao pH fisiológico, o mesmo a expande alcançando seu raio original. O genoma permanece viável, com potencial de transcrição após o retorno ao seu estado original, indicando dessa forma, que esta transformação é meramente estrutural e o RNAfd não está interrompido covalentemente pelo tratamento com pH elevado. Estes estudos ilustram a estabilidade notável do capsídeo e da superação do genoma, atributos que podem ser exigidos para a realização da transcrição contínua de segmentos múltiplos dentro do capsídeo (JAYARAM et al., 2004).



- Regiões não codificadoras (conservadas)
- Quadro de leitura aberta (ORF)
- AUG - Códon de iniciação para síntese protéica
- 5' - seqüência intensificadora, extremidade guanidina
- 3' - seqüência intensificadora, extremidade citosina

Figura 3- Estrutura de um segmento genômico do RNAfd de rotavírus do grupo A (Adaptada de ESTES, KAPIKIAN 2007).

## 2.6 MECANISMO DE EVOLUÇÃO DOS ROTAVÍRUS

Os RV apresentam uma peculiar variação genética e propagação de cepas, a qual se deve à natureza segmentada do genoma. Os RV evoluem por mutações pontuais, rearranjos do gene e recombinações (RAMIG E WARD, 1991; DESSELBERGER et al., 2001).

As mutações pontuais podem acumular-se e serem repassadas para a progênie, podendo formar posteriormente novas linhagens e sublinhagens em um mesmo genótipo (ITURRIZA-GOMARA et al., 2001). Os rearranjos são alterações na seqüência do segmento genômico, na forma de deleção ou duplicação, são resultados de erros de transcrição de um único segmento e possuem a seqüência de um gene. Os rearranjos surgem como produtos de duplicação parcial da ORF do genoma. Uma hipótese para tal fenômeno é que no momento da transcrição a RNA-polimerase RNA dependente apresente uma falha retornando a sua fita molde e reiniciando a transcrição a partir de diferentes estágios (DESSELBERGER, 1996).

O rearranjo entre cepas é comumente detectado sendo considerado um importante mecanismo evolutivo entre cepas circulantes de RV. Acredita-se ocorrer também rearranjos intergenogrupos os quais já são bem documentados (WARD et al., 1991; PALOMBO et al., 1996).

Outra importante fonte de diversidade genética dos RV consiste na introdução de genes de RV animais, por transmissão do vírus inteiro ou por de

rearranjo. Embora haja poucas evidências epidemiológicas, estudos baseados em hibridização do genoma completo e em sequência e análise filogenética parecem apoiar a hipótese de que a transmissão entre espécies pode ocorrer (GRIFFIN et al., 2002, RAHMAN et al., 2003), embora, tais análises geralmente não possam demonstrar a linhagem evolutiva direta entre cepas de origem animal recentes e cepas de origem humana. Na maioria dos casos, sequências de genes das cepas animais segregam, com exceção das amostras humanas, sugerindo uma forte diversificação (BÁNYAI et al., 2004). Nakagomi e Nakagomi (1991 e 2002) forneceram evidências moleculares expressivas que demonstraram o relacionamento interespecies entre cepas humanas e animais, além da existência de recombinação de cepas de RV na natureza.

## 2.7 PROTEÍNAS ESTRUTURAIS

Os RV possuem seis proteínas estruturais descritas abaixo (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 e VP7):

**VP1:** Está localizada no capsídeo interno, possui 125 quilodáltons (kDa) e integra o complexo de replicação. Este complexo atua como uma RNA polimerase dependente de RNA; entretanto, esta proteína necessita da VP2 para a atividade de replicação. A proteína VP1 é a única do *core* que possui uma sequência específica de reconhecimento ao RNA viral. A VP1 é relativamente hidrofóbica e levemente alcalina. Possui atividade de RNA polimerase dependente de RNA, sintetiza os primeiros transcritos virais e, estes por sua vez, funcionam como RNAm que servem de molde para a síntese das demais proteínas do rotavírus (ESTES, COHEN, 1989; MERTENS, 2004).

**VP2:** É codificada pelo segmento dois, é a proteína mais abundante do *core* e também integra o complexo de replicação por sua capacidade de ligar-se aos dsRNA via seus resíduos N-terminais (JAYARAM et al., 2004). Diferente da VP1, esta tem função estrutural bem acentuada, sendo que suas 120 moléculas constituem o envoltório proteico que circunda o genoma viral e, juntamente com a VP6, forma a segunda camada proteica constituindo as partículas da dupla camada denominadas *double-layered particles* (DLPs) (ESTES, COHEN, 1989; ZUCKERMAN et al., 2004). A proteína VP2 é necessária para a atividade de replicase da VP1. Seu grupamento amino terminal possui uma atividade de ligação não específica ao RNA viral, sendo que estudos bioquímicos e estruturais sugerem que este grupamento atua como arcabouço para a correta montagem dos componentes do core viral (LAWTON et al., 1997).

**VP3:** Esta proteína é codificada pelo segmento três, sendo localizada no capsídeo interno. É a menor proteína estrutural, isto faz com que muitas vezes ela migre juntamente com a VP4 em separações eletroforéticas em gel de poliacrilamida (EGPA). É uma proteína básica que contém múltiplas repetições de aminoácidos (aa) e está envolvida na replicação do RNA (ESTES, COHEN, 1989). Sua função é menos conhecida, sabe-se que se liga a covalentemente guanosina trifosfato (GTP), indicando ter atividade de guanililtransferase, além de metiltransferase. Faz parte do complexo de transcrição do vírion, juntamente com a VP1, ligando-se ao RNA de fita simples (MERTENS, 2004). Ela também forma um complexo de transcrição em conjunto com a VP1 (KAPIKIAN, HOSHINO, CHANOCK, 2001).

**VP4:** É uma proteína não glicosilada, possuindo 88 kDa de massa molecular, 775 aa e forma projeções diméricas a partir do capsídeo externo de vírions maduros (BOTH et al., 1994; ESTES E GREENBERG, 2013). A VP4 tem sua síntese relacionada ao quarto segmento genômico. Estudos mostraram que a VP4 é a principal mediadora do processo de entrada na célula, estando implicada não somente na adsorção e penetração na célula, como também na hemaglutinação, neutralização e virulência (JAYARAM et al., 2004; ESTES, GREENBERG, 2013). Esta proteína é susceptível à proteólise com evidências de que as clivagens proteolíticas realçam a capacidade infectante viral e facilitam a entrada do vírus na célula (ESTES et al., 1981; ARIAS et al., 1996). Na proteólise, a VP4 é clivada em subunidades formando VP8\* (localizada no segmento N-terminal, a 28kDa) e VP5\* (localizada no segmento C terminal, a 60 kDa ), que permanecem ligados ao vírion.

**VP5\*:** Está associada com a atividade de neutralização cruzada entre os diferentes tipos de VP4 e possui epítomos responsáveis pela adsorção do vírus à célula. Também é associado com a restrição da replicação de certas amostras de RV em cultura de células (GREENBERG et al., 1983 ). A subunidade VP8\* tem sido encontrada exercendo um papel significativo no potencial infeccioso viral e no processo de neutralização.

**VP8\*:** possui cinco epítomos de neutralização localizados nas posições M1-L10, I35-R44, I55-D66, V115-G123 e L223-P234 (KOVACS et al. 2003). O peptídeo VP4 contém grande parte dos epítomos relacionados às reações tipo específicas (JAYARAM et al., 2004).

**VP6:** A proteína VP6 forma o capsídeo intermediário, sendo constituída de 780 cadeias polipeptídicas de VP6, que estão distribuídas como 260 trímeros que se

arranjam em uma estrutura de superfície contendo um total de 780 monómeros de VP6 (GRANT, GRIGORIEFF, 2015). O domínio de trimerização dessa proteína situa-se entre os aa 246 e 314, necessário para a formação das partículas de dupla camada (MATHIEU et al., 2001, CHARPILLENNE et al, 2002; ESTES, GREENBERG, 2013). A VP6 é codificada pelo sexto segmento genômico, participa da entrada do vírus na célula e da transcrição dos dsRNA. A VP6 foi referida como estando envolvida na entrada do RV na célula através da sua ligação à proteína de choque térmico celular (hsp70) (GUALTERO et al., 2007); que pode ser relacionada com a presença de epítomos neutralizantes em VP6. Os resíduos 296 a 259 e 305 são importantes no processo de reconhecimento pelos Mabs de subgrupo (Figura 4). É uma proteína muito presente no virion, representando 51% do mesmo, com massa molecular de 41kDa. Apresenta caráter hidrofóbico sendo a principal portadora dos determinantes antigênicos, os quais permitem classificar os RV em diferentes grupos e subgrupos (ESTES, GREENBERG, 2013).

A VP6 forma trímeros e túbulos, sendo estável, e mantendo, assim sua conformação independente da presença de outras proteínas (CHARPILLENNE et al., 2002; GREIG et al., 2006; ESTES, GREENBERG, 2013). Essa proteína exerce papel estrutural importante por apresentar dois domínios distintos, um proximal de hélices- $\alpha$  (domínio B) e outro distal de folhas  $\beta$  (domínio H), os quais permitem sua interação com a proteína do core (VP2) e ambas as proteínas do capsídeo externo (VP4 e VP7) (MATHIEU et al. 2001; CHARPILLENNE et al., 2002).

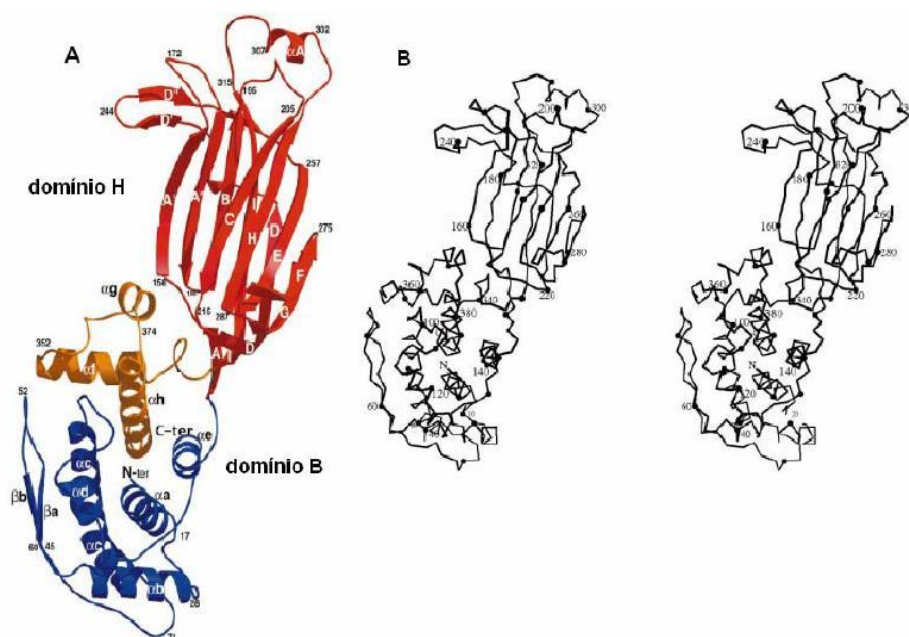




Figura 4- A subunidade proteica de VP6. (A) Domínio H (resíduos 151-331) em vermelho e os dois segmentos que formam o domínio B em azul (resíduos 1-150) e em laranja (resíduos 331-397). Elementos estruturais secundários predominantemente em hélice- $\alpha$  são visualizados no domínio B. São observadas hélices- $\alpha$  tanto no primeiro segmento do domínio B ( $\alpha$ -a a  $\alpha$ -e) como no segundo ( $\alpha$ -f a  $\alpha$ -h). Para o domínio H, folhas  $\beta$  em "jelly-rolls" representadas por letras de A-I. Adicionalmente, folhas- $\beta$  (ausentes no "jelly-rolls" padrão) estão indicadas por letras pareadas ( $\beta$ a e  $\beta$ b). (B) Traço C $\alpha$  estereó da subunidade de VP6 mostrando resíduos de aa enumerados de 20 em 20 (Adaptado de MATHIEU et al., 2001).

A VP6 desempenha um papel importante na detecção de RVA, sendo o antígeno alvo primário para técnicas sorológicas de diagnóstico de rotina, tais como ensaio imuno enzimático (EIE), imunofluorescência e imunocromatografia (GREENBERG et al, 1983; ESTES, GREENBERG, 2013). Esta proteína está sendo considerada como uma possível candidata a vacina alternativa contra o RVA, uma vez que pode produzir resposta imune de forma cruzada a diferentes tipos de RVA, podendo ser utilizada como uma vacina universal a qual protegeria contra todas as variantes de RV (JALILVAND et al., 2015).

**VP7:** É uma glicoproteína localizada no capsídeo externo, com elevada imunogenicidade, induzindo a síntese de anticorpos neutralizantes. É codificada pelos segmentos genômicos 7<sup>o</sup>, 8<sup>o</sup> ou 9<sup>o</sup>. A ORF da VP7 codifica para 326 aa. A VP7 apresenta nove regiões variáveis (VR1-VR9) e dentro destas, 6 regiões são consideradas sítios antigênicos, região A (aa87-101), região B (aa142-152), região C (aa208-223), região D (aa291), região E (aa189-191) e região F (233-242) (KIRKWOOD et al. 1993).

Sob pressão seletiva do hospedeiro, essa proteína apresenta alterações em seus epítomos que expressam diferentes genótipos (ESTES, GREENBERG, 2013). Postula-se que a VP7 pode modular a função da VP4 durante os processos de adsorção e penetração na célula e pode interagir com moléculas de superfície após a interação iniciada com a VP4 (MENDEZ et al., 1999; JAYARAM et al., 2004). Estudos têm demonstrado que concentrações adequadas de ions cálcio (Ca<sup>++</sup>) são necessárias para manter a estabilidade da partícula. Pequenas concentrações de Ca<sup>++</sup>, como as que ocorrem no citoplasma, provocam a formação de partículas incompletas ou *double-layered particles* (DPLs), que são ativadas para transcrição e necessárias no ciclo de replicação do vírus (ESTES, GREENBERG, 2013).

## 2.8 PROTEÍNAS NÃO ESTRUTURAS

Os RV possuem seis proteínas não estruturais (NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 e NSP6), as quais são encontradas na célula infectada, mas não no vírion. As proteínas não estruturais dos RV participam dos complexos de replicação pela capacidade de se ligarem ao RNA e atuarem como chaperonas de transporte. Além disso, participam dos sítios de replicação e montagem viral, bem como na condução dos segmentos para o processo de encapsidação (ESTES, COHEN, 1989).

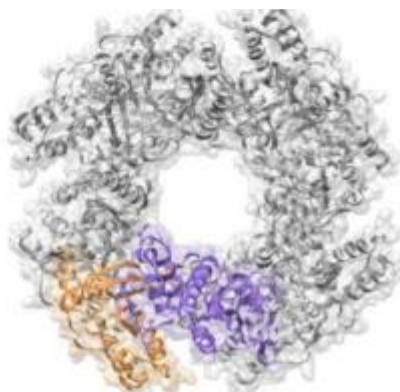
**NSP1:** É codificada pelo 5º segmento genômico, estando associada com o citoesqueleto celular facilitando a ligação do vírus à célula. É uma glicoproteína pouco conservada, com relativa variabilidade de sequências quando comparada à outras proteínas estruturais, não sendo portanto, uma proteína essencial para a replicação (MERTENS, 2004; ESTES, GREENBERG, 2013). Possui uma característica comum das proteínas que se ligam a ácidos nucleicos que é uma região rica em cisteína na região amino terminal, a qual provavelmente esteja envolvida na replicação de RNA (KAPIKIAN, HOSHINO, 2001). A NSP1 interage com os fatores de regulação 3, 5 e 7 da célula hospedeira, acredita-se que esta interação induza a degradação dos fatores de regulação através do proteassoma, o que resulta na supressão da resposta de interferon (IFN) tipo I, sendo assim a NSP1 é considerada uma proteína antagonista de INF (ARNOLD, BARRO, PATTON 2013).

**NSP2:** Esta proteína pode ser codificada pelos segmentos 7, 8 ou 9 dependendo da origem do RV, é altamente conservada e expressa significativamente nas células infectadas, localizando-se no viroplasma. A NSP2 tem três diferentes funções, NTPase (Nucleotídeo Trifosfatase), RNA ligante e desestabilizadora da dupla hélice do RNA viral (JAYARAM et al., 2004). Parece ainda, associar-se com a NSP5 (figura 5) e envolver-se nos processos de replicação e encapsidação do RNA. A NSP2 pode desestabilizar hélices de ácidos nucleicos e atuar como NTPase (MERTENS, 2004; ESTES, GREENBERG, 2013). Esta proteína parece atuar direta ou indiretamente com outras proteínas estruturais presentes no viroplasma, tais como a VP1 e a VP2 que são inclusões citoplasmáticas formadas nas células infectadas (HU et al., 2012). Estas estruturas dinâmicas são altamente organizadas, atuam como recrutas para os componentes intermediários da replicação viral, empacotamento do genoma viral no início da montagem da capsídeo intermediário e nos primeiros estágios da montagem das DLPs (FABBRETTI et al., 1999; PATTON et al., 2006).

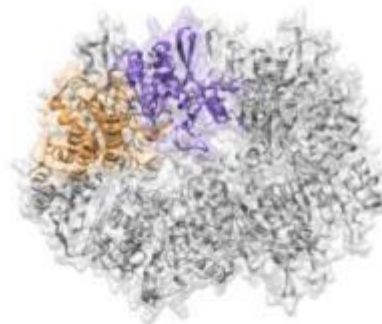
(c) Monomero NSP2



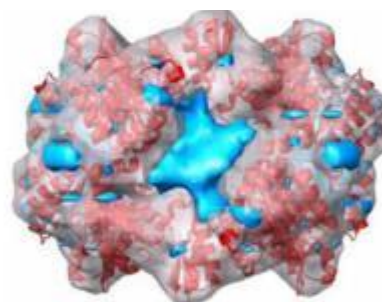
(D) Octamero NSP2



(E) Octamero NSP2



(F) Complexo NSP2/NSP5



(G) Complexo NSP2/RNA

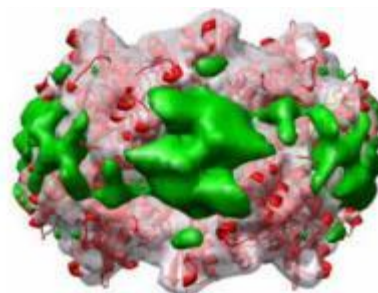
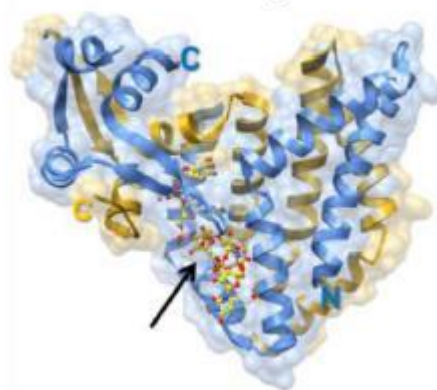


Figura 5- Estruturas de NSP2 (C-E) e seus complexos com a NSP5 e RNA (F-G). Adaptada de HU et al., 2012.

**NSP3:** É uma proteína de 36,4 kDa, codificada pelo segmento 7. Encontra-se envolvida na tradução dos transcritos virais. Possui conformação de um homodímero, reconhecendo a sequência consenso 3' do RNA mensageiro (RNAm) favorecendo a tradução dos transcritos de RNAm aos ribossomos, além de prevenir a degradação dos mesmos por nucleases celulares (DEO et al., 2002; JAYARAM et al., 2004, HU et al., 2012). O domínio N-terminal de NSP3 (NSP3-N) (figura 6) se liga à sequência consenso 3' (DEO et al., 2002), o domínio C-terminal (C-NSP3) interage com eIF4G, resultando em circularização do mRNA viral através da proteína de ligação a eIF4E.

Durante a infecção viral, NSP3 se liga a eIF4G com maior afinidade do que o PABP (Proteína de Ligação), aumentando assim a tradução de transcritos virais (GROFT et al., 2002). A NSP3 também antagoniza parte da resposta imune inata (DESSELBERGER, 2014).

**(A) Domínio N terminal de NSP3/complexo RNA**



**(B) Domínio NSP3 C-terminal/complexo peptídios eIF4G**

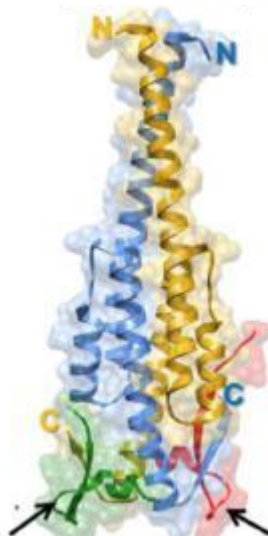


Figura 6: A- Homodímero do domínio de ligação do terminal N de NSP3 ao complexo RNA e B- estrutura do domínio NSP3 C-terminal em complexo com peptídios eIF4G. Adaptada de HU et al., 2012.

**NSP4:** É uma glicoproteína multifuncional que atua na morfogênese, replicação viral e na patogenia da infecção por RV. Sua síntese ocorre inicialmente no retículo endoplasmático e desempenha papel fundamental na maturação do vírus (SASTRI et al., 2014). É codificada pelo segmento 10 e possui três domínios hidrofóbicos, H1, H2 e H3 que se encontram na porção N-terminal (figura 7). Apresenta

dois sítios de glicosilação situados em uma pequena alça nas posições dos aa 8 e 18 o H2 corresponde ao domínio transmembrana que ancora a NSP4 na bicamada lipídica do RE e o H3 que é um domínio de oligomerização localizado no citoplasma. A cauda de localização citoplasmática de aproximadamente 131 aa expressam as sequências responsáveis pelas funções biológicas conhecidas dessa proteína, como o domínio de oligomerização (resíduos 95-135) organizado de forma tetramérica em  $\alpha$ -hélice que corresponde ao sítio de ligação com o  $\text{Ca}^{++}$  e que confere estabilidade á proteína (BOWMAN et al., 2000, O'BRIEN et al., 2000, HUANG et al., 2004, ESTES, GREENBERG, 2013).

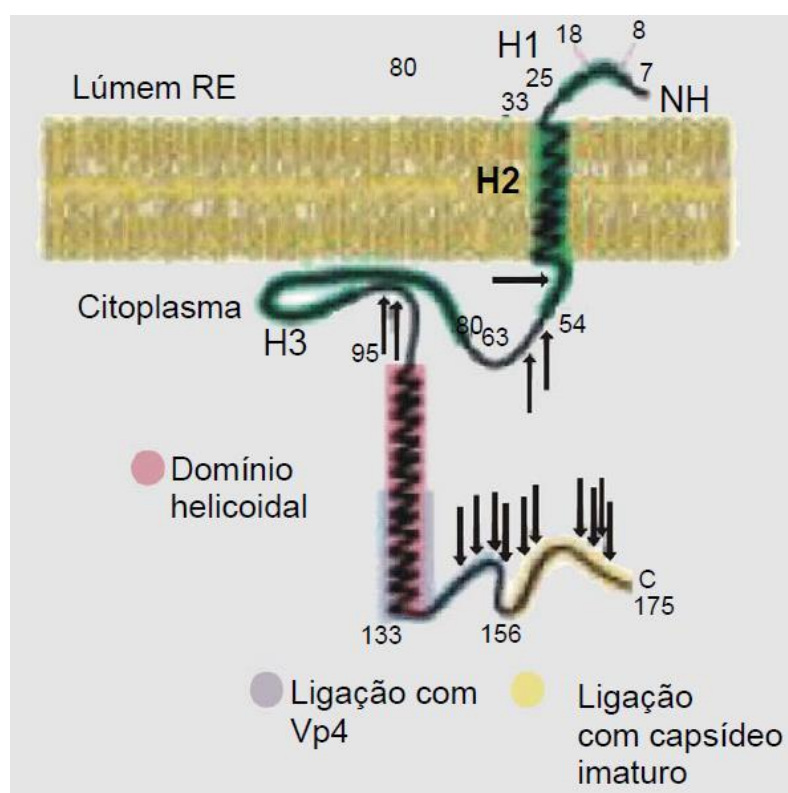


Figura 7- Representação esquemática da NSP4 de RV: Detalhes de sua localização na membrana do retículo endoplasmático (Adaptada de BOWMAN et al., 2000).

O gene NSP4 tem sido classificado dentro dos grupos A, B e C. O grupo A compreende cinco genótipos: A (KUN), B (Wa), C (AU-1), D (EW) e E (avian-like) (CIARLET et al., 2000; ITO et al., 2001; MORI et al., 2002; MASCARENHAS et al., 2007). A NSP4 possui dois sítios de glicosilação, localizando-se em uma pequena alça no lúmen do retículo endoplasmático (RE), um domínio transmembrana, um domínio de oligomerização, um sítio de ligação com a VP4 e uma região de aproximadamente 20 aa para ligação com o capsídeo imaturo (VP6) (HUANG et al., 2004). O peptídeo da NSP4

correspondente aos resíduos 48-91 aa, é capaz de desestabilizar a membrana do retículo endoplasmático rugoso (RER), levando a um aumento de íons  $\text{Ca}^{++}$ , efeito potencializado na presença do peptídeo para as regiões 48-175. A somatória desses eventos gera uma diarreia de natureza secretora (ESTES, GREENBERG, 2013; HUANG et al., 2004).

**NSP5:** É codificada pelo 11º segmento e apresenta atividade compatível com uma autoquinase. A NSP5 em células não infectadas atua na NSP2, de forma a induzir a hiperfosforilação da NSP5. Durante a replicação, as proteínas NSP2, NSP5 e NSP6 estão associadas à formação de viroplasmata. A NSP5 é uma fosfoproteína dimérica, existe em várias isoformas, a partir de uma forma hipofosforilada de 28-kDa e na forma hiperfosforilada de 32-kDa, durante o curso da replicação do rotavírus (AFRIKANOVA et al., 1996; BLACKHAL et al., 1998; HU et al., 2012). A NSP5 interage com outras proteínas de rotavírus, tais como VP1, VP2 (BEROIS et al., 2003) e NSP6 (TORRES-VEGA et al., 2000), e também com o RNA de cadeia dupla de uma forma independente da sequência (VENDE et al., 2002).

Estes estudos revelam que a NSP5 está envolvida em muitos processos, tais como a dinâmica e regulação do viroplasma e um adaptador para integrar as várias propriedades funcionais da NSP2 com outras proteínas de rotavírus durante a replicação do genoma viral e encapsidação (CONTIN et al., 2010).

**NSP6:** É encontrada em células infectadas pelo vírus sob forma de inclusões citoplasmáticas, sendo codificada por uma ORF do 11º segmento. Esta proteína interage com a NSP5, evidenciando sua participação na replicação e encapsidação do vírus (ESTES, GREENBERG, 2013).

## 2.9 EPIDEMIOLOGIA DOS RVA CIRCULANTES

Embora as vacinas contra o RVA tenham apresentado eficácia comprovada, novos genótipos e surtos resultantes da combinação de genótipos raros têm surgido (CHUNG et al., 2015). A variabilidade dos RVA circulantes é amplamente demonstrada nos diversos estudos desenvolvidos em todo o mundo (SANTOS, HOSHINO, 2005; GURGEL et al., 2008; LEITE et al., 2008; CLARK et al., 2011; MODARESS et al., 2011; GUERRA et al., 2015).

Apesar da grande diversidade genômica e antigênica dos RV, globalmente apenas um pequeno número de tipos de RV têm prevalecido em seres humanos durante

as últimas 3 décadas, representando mais de 88% dos tipos detectados, sendo eles G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8], G9P[8] e, mais recentemente G12P[8]/P[9] que têm co-circulado em alta frequência (GENTSCH et al, 2005; SANTOS, HOSHINO, 2005; ITURRIZA-GÓMARA et al, 2011; BÁNYAI et al., 2011; TROJNAR et al., 2013; WU et al., 2014; CHUNG et al., 2015). A maior diversidade de estirpes de rotavírus é encontrada nas regiões da África e Ásia e as possíveis razões para esta alta diversidade incluem a prevalência de casos de infecções mistas com várias cepas de rotavírus e/ou habitação em estreita proximidade aos animais domésticos (SHARMA et al., 2009; LIN et al., 2014).

A vigilância de cepas de RV no Brasil ainda é bastante irregular, e a maioria dos estudos foram realizados entre as crianças com menos de cinco anos de idade, mesmo antes da introdução da vacina (TIMENETSKY et al., 1994; MORILLO et al., 2010; LINHARES et al., 2011). Estudo conduzido por Luchs *et al.* (2015) identificou que a frequência de infecção por RV detectado no Brasil foi de 19,1%, menor do que proporções globais (24,3%), bem como os observados em estudos realizados em outros países da América Latina: Argentina (28,3%), Bolívia (28,9%), Chile (31,1%), Colômbia (30%), Costa Rica (44,3%), Equador (30,9%), Guatemala (30,1%), Panamá (24,9%), Paraguai (25,3%), Peru (25,1) e Uruguai (37,5%). Esse estudo detectou uma redução dos casos de infecção por RVA tanto em crianças menores de cinco anos como naquelas com maior idade que não foram vacinadas, sugerindo que as crianças agem como portadores primários da infecção, sendo que essa proteção indireta ocorre como resultado da redução da transmissão do RVA na comunidade, ampliando os benefícios da vacinação mesmo para aqueles sujeitos não vacinados.

O panorama do RVA antes da implantação da vacina contra o RV era de prevalência do genótipo G1 entre os tipos usuais (figura 8) (SANTOS, HOSHINO, 2005; ARISTA et al., 2005; LEITE et al., 2008, CARVALHO-COSTA et al., 2011). Contudo, na era pós-vacina, a detecção de G1 chegou a representar 3% das amostras analisadas, porém a partir de 2010, esse tipo passou a circular com maior frequência, sendo detectado em mais de 36,6% das cepas circulantes (DE DONNO et al., 2009; SOARES et al. 2010; CARVALHO-COSTA et al., 2011; GUERRA et al., 2015; BANAJEH, BASHEER, 2015; NIRWATI et al., 2016).

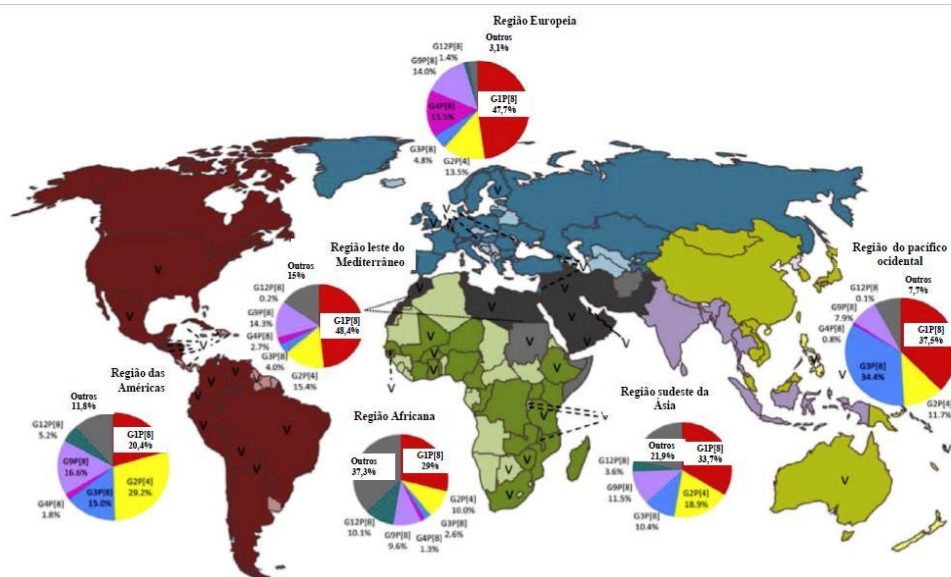


Figura 8: Distribuição geográfica das amostras de RV humanos de grupo A detectadas entre 2007 e 2012. Adaptado de DÓRO et al.(2014).

Na era pós-vacina (figura 8), vários países começaram a detectar um aumento significativo na frequência do genótipo G2, fato este que ocorreu tanto em locais que implantaram, como naqueles que não implantaram a vacina contra o RV (MASCARENHAS et al., 2010; AHMED et al., 2010; TATTE et al., 2010; FINAMORE et al., 2011; DONATO et al., 2014; GUERRA et al., 2015). Estudo realizado no Brasil demonstrou o ressurgimento de RV-A genótipo G2P [4] no Brasil no período de 2005 a 2008, evidenciando que a taxa de detecção de G2P [4] foi reduzida em 2009, provavelmente refletindo oscilações naturais de genótipos de RV-A (figura 9).



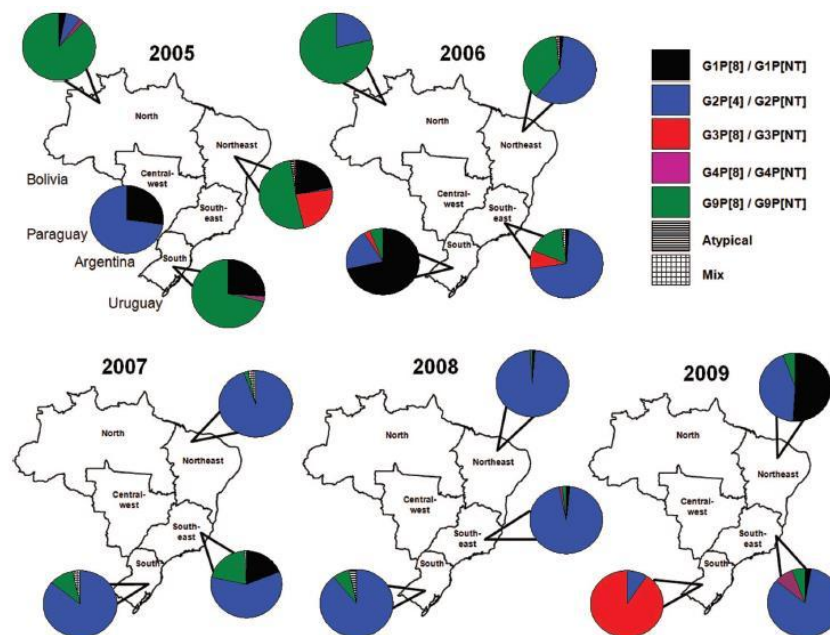


Figura 9: Localização geográfica dos genótipos de RVA detectados no Brasil no período de 2005 a 2009. (Adaptado de CARVALHO-COSTA et al., 2011).

Com a implantação da vacina passou-se a registrar uma maior ocorrência nos casos de infecções mistas por RV (BANAJEH, BASHEER, 2015; GUERRA et al., 2015). Foi identificado também um maior número de combinações não usuais como G1P[4], G3P[9], G3P[8], G4P[6] e G9P[4] (KIM et al., 2014; MANEEKARN, KHAMRIN, 2014).

Devido às altas taxas de cobertura vacinal no país, as cepas G1P[8] foram detectadas em baixa prevalência. A frequência de detecção das cepas G9P[8] diminuiu abruptamente nos 2 anos seguintes após a introdução da Rotarix®, ressurgindo como o genótipo dominante em 2011 e, em seguida, diminuindo novamente de modo rápido em 2012. Em contraste, a G3P[8], raramente detectado nas Regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil por 3 anos consecutivos (2006 a 2008), elevou progressivamente sua taxa de detecção ao longo de 2009, 2010 e 2011, atingindo pico de prevalência em 2012 e 2013. G12P[8] foi detectada pela primeira vez, com baixa prevalência, durante as temporadas de 2008 e 2009. Entre 2011 e 2012, as cepas G12P[8] exibiram um aumento gradual de circulação. Em 2013, a detecção de G12P[8] diminuiu drasticamente, para, de repente, reemergir como o genótipo mais prevalente em 2014 (LUCH et al., 2016).

A maior parte dos estudos sobre a diversidade genética dos RVA estão limitados aos genes VP7 e/ou VP4. Pelo fato do genoma segmentado que o RV possui, ele é mais vulnerável a eventos de rearranjo frequentes e, portanto, as análises completas do genoma RVA são essenciais para identificar a verdadeira origem de uma

cepa (GHOSH et al., 2011). Estudos envolvendo a caracterização molecular dos genes VP1, VP2 e VP3 de RV bovinos, caprinos e suínos demonstraram, após análise filogenética, haver características similares entre RVA animal e humano, bem como de humano e animal, destacando-se a conservação de várias porções gênicas (VARGHESE et al., 2006; MUKHERJEE et al., 2009; GHOSH et al., 2011; KOMOTO et al., 2016).

Em Belém, Mascarenhas et al. (2007) encontraram RVA humano com sequências nucleotídicas dos genes VP4 e NSP4 semelhantes às de origem suína, sugerindo transmissão entre espécies. Enquanto que Benati et al (2010), analisando os mesmos genes em amostra G3P[9] no Rio de Janeiro, sugeriram a transmissão entre espécies humano-felino-canino.

Matthijnsens et al. (2008) ao descrever a primeira detecção em humanos da amostra G6P[6], evidenciou a presença dos genes VP7 e VP3 de origem bovina, enfatizando a possível transmissão entre espécies.

Estes fenômenos podem causar um considerável impacto no processo de controle e prevenção contra o RV, principalmente no que concerne ao desenvolvimento e implantação de imunizantes seguros e eficazes, estratégia esta, extremamente necessária, sobretudo nos países em desenvolvimento (SANTOS, HOSHINO, 2005; FREITAS et al., 2008).

## 2.10 EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DO ROTAVÍRUS GENÓTIPO G2

O RVA tipo G2 se constitui entre todos, o mais variável em suas características genéticas. Apresenta perfil eletroforético de migração curta, pertence ao genogrupo DS-1, geralmente está associado ao tipo P1B[4] de VP4 e possui especificidades com o SGI de VP6 e NSP4 tipo A (KAPIKIAN et al., 2001).

Estudos têm detectado a ocorrência de RVA genótipo G2 com padrão eletroforético longo, fato que pode surgir como resultado de um rearranjo genético em condições naturais entre RV pertencentes aos dois maiores genogrupos, o Wa e o DS-1 (WARD et al., 1991; NAKAGOMI, NAKAGOMI, 1991; KAGA, NAKAGOMI, 1994). Ahmed et al (2005) apresentaram evidências que sugerem ocorrer rearranjo entre espécies de cepas de RV animal e cepas humanas, com posterior evolução para uma cepa capaz de causar infecção sintomática em seres humanos.

O RVA genótipo G2 esteve durante muito tempo associado a surtos de diarreia em crianças e adultos e alguns autores defendiam uma ocorrência natural cíclica deste tipo (LINHARES, VELÁZQUEZ, 2008). Sua natureza ainda reserva aspectos intrigantes, por sua capacidade de ressurgir repentinamente e causar surtos em larga escala mesmo depois de ter passado anos sem circular (ZAO et al., 1999).

Em 1997 e 1999, o genótipo G2 foi o mais detectado em vários países africanos (PAGE, STEELE, 2003). Em Bangladesh no período de 2004 a 2006 este genótipo foi o mais prevalente em crianças e adultos. Tal fato foi também observado em vários países como China, Taiwan, África do Sul e Brasil (ARISTA et al., 2005; LEITE et al., 2008). Estudo publicado em 2010 mostrou ser o genótipo G2 aquele de maior ocorrência (45,5%) em Bangladesh, no período de julho de 2005 a junho de 2006 (AHMED et al., 2010). Outro estudo conduzido em dois períodos (1993-1996 e 2004-2007) em Pune, Índia, identificou o genótipo G2P[4] como o mais prevalente no segundo período, mostrando que as amostras agruparam dentro das linhagens, I e Iib de G2 (TATTE et al., 2010).

No Brasil o genótipo G2 de RVA foi detectado nos anos de 1992-1994 em 83,6% das amostras de crianças diarreicas de 0-5 anos (GUSMÃO et al., 1999). No período de 1992-1998, um estudo desenvolvido em Belém por Linhares et al. (2002) identificaram a presença do G2 em 62,7% dos casos estudados. O genótipo G2P[6] foi identificado em 98% dos casos investigados em Belém, Pará (MASCARENHAS et al., 2007). Em Goiânia e Salvador os RVA genótipo G2P[4] foi o mais predominante no período de 2005-2006 (MUNFORD et al., 2009).

Uma revisão de 12 estudos realizados em Belém, ao longo de 26 anos mostrou que o RVA genótipo G2 esteve presente em 32,1% dos casos investigados. Nos períodos de 1981-1990, 1982-1986, e 1990-1992, a ocorrência de RVA genótipo G2 variou de 14,6% e 26,3%. De 1992-1994 e 1996-1998 este tipo foi responsável por 76,7% e 60,7% dos casos ocorridos, respectivamente. Seguiu-se a essa estação de RVA genótipo G2, uma queda abrupta nos cinco anos seguintes, chegando a não ser detectado no ano de 2003 e ressurgindo como o genótipo mais prevalente no início de 2006, antes da introdução da vacina contra RVA (OLIVEIRA et al., 2012).

Estudo realizado no Sul do Pará nos anos de 2006 e 2008 identificou o genótipo G2P[4] em 90% das amostras testadas, sendo que estes foram classificados como pertencendo a linhagem II, sublinhagem IIa (2006) e IIc (2008) (MASCARENHAS et al., 2010). O G2P[4] foi também predominante entre as cepas de

RVA que circularam durante o estudo de efetividade da vacina Rotarix<sup>®</sup> realizado em Belém, Brasil no período de maio de 2008 a maio de 2009 (LINHARES, 2010).

O surgimento do G2P[4], desde 2006, foi relatado em populações vacinadas na Austrália (Rotarix<sup>TM</sup> e Rotateq<sup>TM</sup>), Nicarágua (Rotateq<sup>TM</sup>) (Kirkwood *et al.*, 2009; Patel *et al.*, 2009), Brasil (Rotarix<sup>TM</sup>) (JUSTINO *et al.*, 2011; GUERRA *et al.*, 2015), mas também - em menor grau - em populações não vacinadas (ESTEBAM *et al.*, 2010). O surgimento do G2P [4] e a alta prevalência deste genótipo, provavelmente segue uma tendência mundial ditada pelas flutuações oscilatórias naturais dos genótipos mais prevalentes em vez de ser um efeito da vacinação (LUCHS *et al.*, 2015).

O monitoramento de cepas de RVA circulando em adultos foi conduzido no Brasil, visando esclarecer a suposta pressão vacinal sobre a população pediátrica. Nesse estudo, uma alta prevalência de G2P[4] também foi observada, sugerindo que essa emergência provavelmente segue uma tendência mundial ditada pelas flutuações oscilatórias dos genótipos de RVA e, aparentemente, não está relacionada à vacinação (LUCHS *et al.*, 2014).

Estudo conduzido em Belém do Pará no período de 2008 a 2010 identificou o genótipo G2P[4] em 57,2% das cepas ao longo de todo o período de estudo com predominância deste genótipo no período de maio de 2008 a janeiro de 2009 (GUERRA *et al.*, 2015).

Uma recente revisão realizada na América Latina com estudos da era pré e pós vacina contra o RV identificou o genótipo G2 como o tipo G mais prevalente no período posterior a implantação da vacina (51,6%) e a combinação G2P[4] como a de maior prevalência no Brasil (54,2%) (SANTOS *et al.*, 2016).

## 2.11 REPLICAÇÃO VIRAL

No processo de replicação viral, somente partículas com triplo capsídeo conseguem aderir-se às células. A proteína VP4 atua no ciclo de replicação, promovendo o reconhecimento do receptor e subsequente penetração celular. A infectividade dos RV *in vitro* é aumentada e depende da presença de tripsina. Este tratamento proteolítico resulta na clivagem de VP4, originando os polipeptídeos VP5\* e VP8\* que são fundamentais no processo de internalização das partículas na célula (ZÁRATE *et al.*, 2000). *In vivo*, os RV possuem um tropismo celular natural pelos

enterócitos maduros do intestino. A replicação ocorre no citoplasma das células absorptivas diferenciadas (figura 10), sendo que as partículas infecciosas são liberadas no lúmen intestinal e a replicação continua na área distal do intestino delgado (ESTES, GREENBERG, 2013; ZÁRATE et al., 2004).

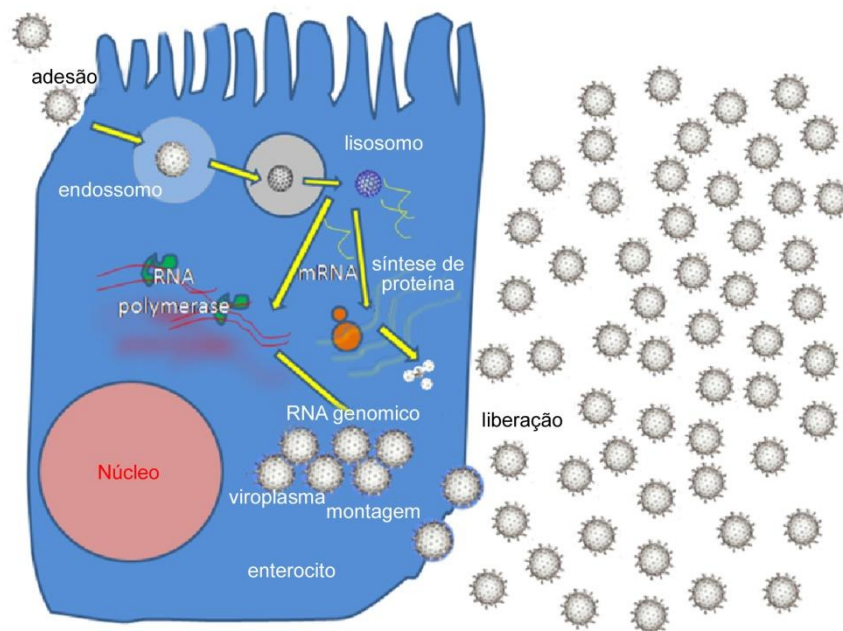


Figura 10: Replicação dos RV (Fonte: commons.wikimedia.org/wiki/file:Rotavírus.rep).

Os receptores para RV incluem gangliosídeos GM1 e GM3, integrinas 21, x2 e v3 e a “proteína de choque térmico” hsc 70 (ARIAS et al., 2001). O ácido siálico pode participar direta ou indiretamente do processo de interação do RV com a célula (KELJO, SMITH, 1988). O ciclo de replicação e a estrutura dos RV são extremamente dependentes da concentração de  $Ca^{++}$  no meio (RUIZ et al., 2000). Após a ligação, o vírus é internalizado, sendo que esta não ocorre entre  $0^{\circ}C$  e  $4^{\circ}C$ , indicando que esse passo requer processo celular ativo (KELJO, SMITH, 1988).

O mecanismo de entrada do RV na célula ainda é obscuro, mas pode ocorrer por entrada direta com a clivagem de VP4 pela tripsina pancreática ou por endocitose sem acidificação do endossoma (RUIZ et al., 1997). O processo endocítico é  $Ca^{++}$  dependente, a ligação do RV ao receptor celular induz à formação de uma vesícula endocítica, isolando a partícula com capsídeo triplo em um compartimento intracelular. Ocorre ainda a redução na concentração do  $Ca^{++}$  no interior das vesículas e, equilibrada

a concentração de  $\text{Ca}^{++}$  com o citoplasma, o vírus perde o capsídeo externo e ocorre a lise vesicular, permitindo que partículas com duplo capsídeo passem para o citoplasma, sendo ativas para a transcrição (RUIZ et al., 2000).

A transcrição dos RV e todas as demais atividades inerentes à replicação do genoma e montagem dos vírions são feitas por enzimas virais (IMAI et al., 1983). Os RNAs transcritos pela RNA polimerase RNA-dependente atuam na síntese das proteínas estruturais e não estruturais, e também servem de molde do RNA para a síntese da fita negativa do material genético (ESTES, GREENBERG, 2013).

A maioria das proteínas virais é sintetizada no viroplasma e a formação de novos vírions envolve a participação das proteínas virais do citoplasma e dos viroplasmas. A formação do core com uma cópia de cada um dos 11 segmentos do genoma dos RV é bastante coordenada (PATTON, SPENCER, 2000). Após a formação das partículas de duplo capsídeo elas saem do viroplasma para o interior do RE adjacente. Estas partículas adquirem temporariamente uma camada lipídica dupla e são provisoriamente envelopadas, contêm as proteínas de superfície, VP7 e VP4 e pequenas quantidades das NSPs (PORUCHYNSKY, ATKINSON, 1991). O envelope lipídico é removido levando a formação dos vírions maduros (ESTES, GREENBERG, 2013; JAYARAM et al., 2004).

Extensas citólises ocorrem no término da infecção e drásticas alterações na permeabilidade da membrana plasmática em células infectadas resultam na liberação das proteínas celulares e virais. Apesar da lise celular, muitas partículas com duplo ou triplo capsídeo permanecem associadas com restos celulares, sugerindo interações com estruturas no interior da célula (MUSALEM, ESPEJO, 1985).

## 2.12 FISIOPATOLOGIA

Após a ingestão, as partículas de RV são transportadas para os enterócitos maduros das porções média e alta do intestino delgado e isso se dá por entrada direta ou por endocitose  $\text{Ca}^{++}$  dependente (Figura 11) (ANDERSON, WEBER, 2004). Durante a replicação dos vírus nos enterócitos, ocorrem morte e descamação dessas células, que são substituídas por outras imaturas das criptas intestinais (enteroblastos), as quais têm capacidade de absorção reduzida. A infecção dos enterócitos é responsável por anomalias estruturais e funcionais do epitélio, originando a diarreia (BLUTT et al., 2007). Observa-se redução da Na/K ATPase, responsável pelo processo de absorção

intestinal do Na acoplado à glicose, havendo redução da absorção deste, assim como de água. Há também redução da atividade inerente às dissacaridases, principalmente da lactase, comprometendo o desdobramento dos dissacarídeos e sua absorção, promovendo um aumento da osmolaridade do lúmen intestinal e consequente aumento do afluxo de líquidos. O açúcar não absorvido pode sofrer ação de bactérias que colonizam as porções mais distais do intestino, resultando na eliminação de fezes com pH ácido, resultando na diarreia de natureza osmótica (PEREZ-SCHAEL et al., 2003).

O processo de replicação viral leva à expressão de genes do vírus e à indução de várias citocinas inflamatórias, redução na expressão de genes do enterócito e vacuolização (CASOLA et al., 1998; ROLLO et al., 1999; BOSHUIZEN et al., 2003). Durante a diarreia ocorre diminuição da digestão de açúcares e da absorção de sais minerais e água, aumentando a gravidade da doença.

Lesões como a infiltração mononuclear da lâmina própria, distensão da cisterna do RE, aumento mitocondrial e presença de microvilosidades esparsas e irregulares também têm sido relacionadas aos RV (MOON, 1997). Estudos demonstraram a participação da NSP4 dos RV, como uma enterotoxina, induzindo a diarreia (BALL et al., 1996; ESTES, MORRIS, 1999). A proteína NSP4 interage com receptores celulares do epitélio intestinal, ativando uma via de sinalização transducional que aumenta os níveis de  $Ca^{++}$ , levando ao aumento da permeabilidade da membrana plasmática ao  $Cl^-$  e da secreção do íon cloreto, induzindo a diarreia (ESTES, GREENBERG, 2013). A NSP4 pode estar envolvida na estimulação do sistema nervoso entérico através da liberação de aminas/peptídeos por meio de células endócrinas das vilosidades intestinais, pelo efeito da NSP4 no  $Ca^{++}$  intracelular (LUNDGREN, SVENSSON, 2001).

Lundgren e Svensson (2001) sugerem que a infecção por RV impede o desenvolvimento dos enterócitos e, posteriormente, afeta a função não apenas do epitélio intestinal, mas também do sistema nervoso. Distúrbio neurológico observado em crianças com infecção por RV onde este infectou o sistema nervoso central causando convulsões (KEIDAN et al. 1992; LYNCH et al., 2001).

Infecções graves por RV diminuem os níveis de pp70S6K, pMAPK, prostaglandina E2 e óxido nítrico e aumentam a toxicidade para impedir o desenvolvimento normal dos enterócitos das vilosidades do intestino delgado e com consequente alteração na estrutura e função do epitélio. Essas mudanças são

susceptíveis de provocar má-absorção e motilidade gastrointestinal anormal durante infecção por RV (SURENDRAN, 2008).

Os RV, por um mecanismo desconhecido evadem do trato gastrointestinal e causam viremia. Casos foram relatados, sugerindo que o RV podem causar infecções em células fora do intestino causando hepatites, nefrites, pneumonia, exantemas, coagulação intravascular disseminada, linfocitose hemofagocítica e complicações neurológicas (YOSHIDA et al., 1995; BLUTT et al., 2007). Antígenos de RV foram detectados em amostras de crianças com diarreia, indicando antigenemia e possível viremia ocorrendo durante infecção por RV (BLUTT et al., 2003; CRAWFORD et al., 2006). As possíveis consequências clínicas da viremia em seres humanos são desconhecidas.

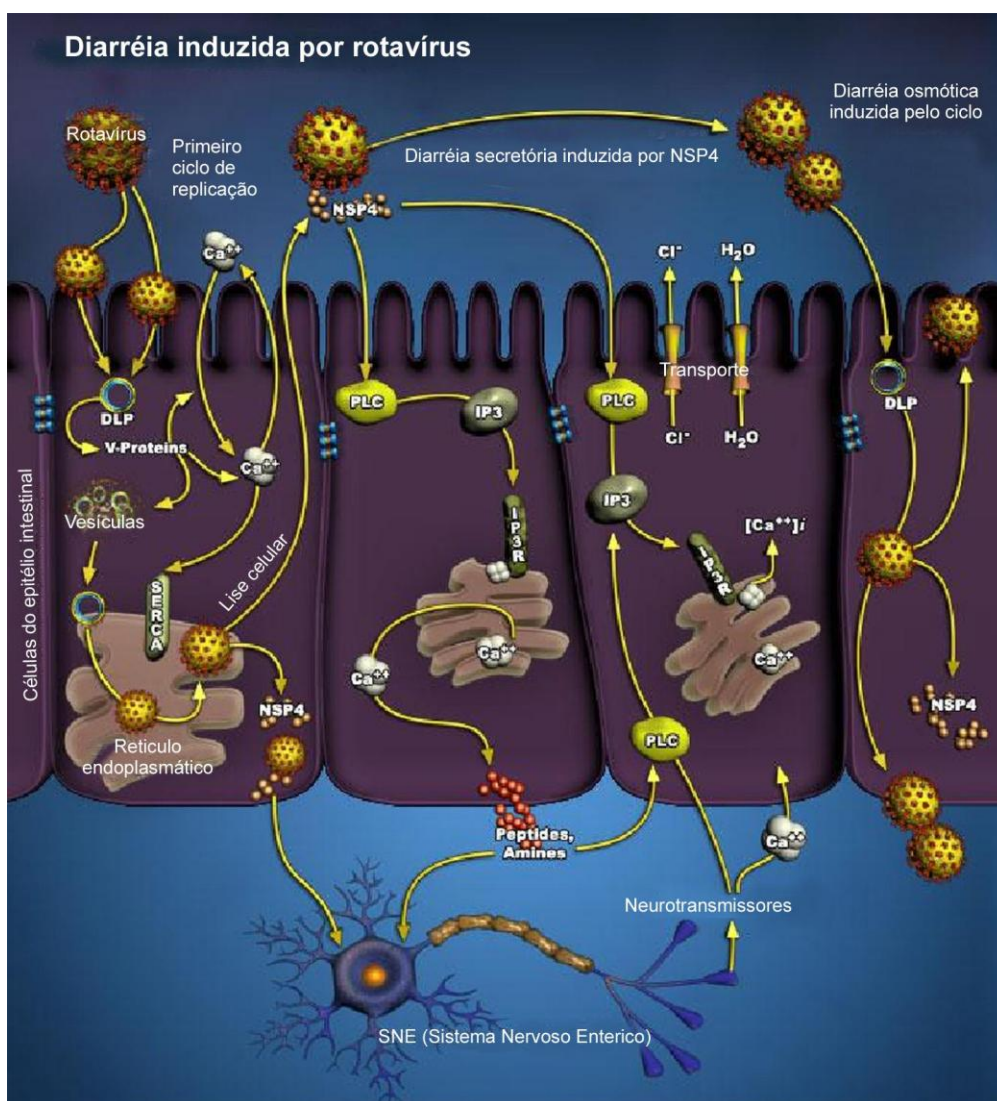


Figura 11: mecanismos de patogênese do RV. No primeiro ciclo de replicação visualizamos os dois mecanismos de entrada do RV na célula (adsorção e penetração), a formação de DPLs, liberação da NSP4



e ativação do SNE; diarreia secretória induzida pela NSP4 com ativação do SNE e a posteriormente, temos a diarreia osmótica induzida pelo  $\text{Ca}^{++}$ . Fonte: [www4.appliedbiosystems.com/tools/pathway](http://www4.appliedbiosystems.com/tools/pathway).

### 2.13 QUADRO CLÍNICO

As manifestações clínicas da infecção por RV podem ser sintomáticas ou assintomáticas, dependendo de fatores do hospedeiro quanto de fatores virais. O quadro clínico das infecções por RV geralmente envolve vômitos, febre, diarreia aquosa e desidratação variando de leve a grave, além de dor abdominal. Vômitos e febre geralmente perduram por dois ou três dias, enquanto a diarreia geralmente persiste por cinco a oito dias (LINHARES, BRESEE, 2000). Entretanto, o quadro pode agravar-se ou até mesmo levar a morte, quando associado a desnutrição ou a quadros de desidratação grave. A diarreia geralmente é autolimitada e a recuperação do paciente tende a ocorrer num período de sete a dez dias (BISHOP, 1996).

A infecção por RV pode ocorrer de forma assintomática ou levar à gastroenterite aguda, com diarreia variando de leve a grave, vômito e desidratação. A diarreia é precedida de um período de incubação de um a três dias, evoluindo com episódios de vômitos em mais de 50% das situações, com subsequente febre e diarreia. Os vômitos, geralmente, precedem a diarreia, ocorrendo por um período de 3 a 5 dias, gerando um grave desequilíbrio hidroeletrólítico e levando à desidratação grave que quando não tratada ocasiona a morte. Eventualmente os vômitos se tornam constantes, levando a desidratação (KAPIKIAN et al., 2001). O quadro diarreico varia de quatro a oito dias, com a presença de muco em 25% dos casos (RODRIGUEZ et al., 1978). A febre é registrada em mais da metade dos casos, com temperatura axilar  $\geq 39^{\circ}\text{C}$ . Adultos e crianças com imunidade deficiente quando infectados por RV podem manifestar gastroenterite prolongada (MORILLO et al., 2010).

Alguns pesquisadores têm associado a infecção por RV a outros sinais clínicos como infecção do sistema nervoso central (ITURRIZA-GÓMARA et al., 2001), com edema agudo hemorrágico infantil (DI LERNIA et al., 2004) e diabetes autoimune (BLOMQVIST et al., 2002).

## 2.14 IMUNIDADE

A resolução de uma gastroenterite depende em grande parte da resposta imunológica. Em um hospedeiro normal, os antígenos de RV são transportados em placas de Peyer, processadas por células B, macrófagos ou células dendríticas e apresentadas às células T auxiliares. Isto culmina com a estimulação de células B RV específicas e proliferação dos linfócitos T citotóxicos precursores (OFFIT, 1996; ANDERSON, WEBER, 2004). Estudos mostraram que após uma infecção por RV as concentrações de Ig A atingem seu pico nos dias 14 a 17 e persistem ao longo de um ano, com posterior declínio na sua concentração. Esses resultados sugerem que a IgA é o mais consistente marcador de proteção contra RV (BERNSTEIN et al., 1989; ANDERSON, WEBER, 2004). Entretanto, a IgA para RV é frequentemente não detectável em fluidos duodenais ou fezes após a primeira semana de infecção (OFFIT, 1996; ANDERSON, WEBER, 2004).

Muitas das infecções sintomáticas por RV ocorrem entre o terceiro mês e o segundo ano de vida, com um pico de incidência entre o 7º e o 15º meses. Infecções por RV são mais frequentemente graves em crianças com 3 a 24 meses de idade, do que nos mais velhos ou adultos (CHRYSTIE et al., 1978; PEREZ-SCHAEL et al., 1987; DENNEHY, 2008). Estudos longitudinais demonstraram que as infecções por RV naturalmente adquiridas induzem uma proteção frente à reinfecção pelo vírus, fato muito importante para prevenir eventos mais graves da doença (VELAZQUEZ et al., 1996; FISCHER et al., 2002). Embora as crianças possam ser infectadas por RV várias vezes durante sua vida, a infecção inicial após os 3 meses de idade mais provavelmente pode causar diarreia grave e desidratação.

Estudos têm demonstrado que a resposta imune frente à primeira infecção por RV é predominantemente homotípica quanto à indução de anticorpos neutralizantes específicos (VELAZQUEZ et al., 1996). Os RV podem escapar à ação do sistema imune e induzir uma nova infecção através de vários mecanismos. São múltiplos os grupos, subgrupos e sorotipos, em subseqüentes infecções, e a resposta passa a assumir caráter heterotípico, daí podendo advir proteção cruzada (CLARK et al., 1985; CHRISTY et al., 1988; MATSON et al., 1992; ORYAN et al., 1994; JIANG et al., 2002; ANDERSON, WEBER, 2004; DENNEHY, 2008).

A maioria das mães possui anticorpos contra RV que são repassados aos filhos via transplacentária, protegendo o neonato. Conseqüentemente, a maioria dos

recém nascidos infectados mostra-se assintomática ou desenvolverá doença branda (BISHOP et al., 1983; DENNEHY, 2008), exceção feita aos bebês prematuros que apresentam um maior risco de doença grave devido à ausência de anticorpos maternos compartilhados via transplacentária (NEWMAN et al., 1999).

A VP6 é o antígeno dominante quanto à propriedade de induzir resposta imune à infecção por RV humano (SVENSSON et al., 1987). As imunoglobulinas do tipo A do soro ou anticorpos IgG atuam reagindo contra o antígeno VP6 em ensaios imunoenzimáticos (FRANCO et al., 1996).

A imunidade local no intestino parece ser importante para proteção contra infecções subsequentes. Os níveis de IgA anti-RV no soro, medido imediatamente após a infecção, geralmente refletem níveis de IgA da mucosa e parece ser os melhores marcadores de proteção (FRANCO et al., 2006).

A resolução da infecção por RV envolve CD8, linfócito T citotóxico e resposta de anticorpos (FRANCO et al., 1997; MCNEAL et al., 1997). Demonstraram-se elevados níveis de citocinas, interferon  $\alpha$ , interleucina 10 (IL10) e fator de necrose tumoral (TNF $\alpha$ ) em soro e plasma de crianças com RV. Portanto, sugere-se que a imunidade humoral e a mediada por células exercem um importante papel na resolução de uma infecção em curso causada por RV, além da proteção frente a infecções subsequentes (JIANG et al., 2003).

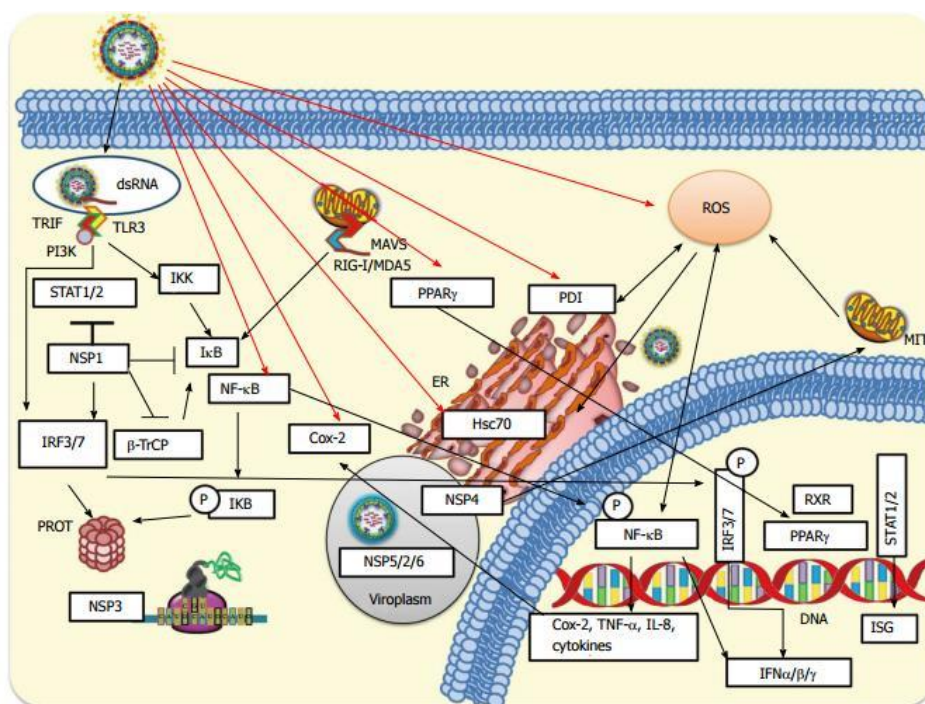


Figura 12: Resposta celular inata á infecções por RV. Durante internalização do rotavírus o ácido nucleico viral pode ser exposto e reconhecido por receptores do tipo Toll (TLR3) ou receptores intracelulares RIG-I-Like (RLRs). RLRs ativados podem ligar e ativar a proteína mitocondrial de sinalização antiviral (MAVS), que recruta um complexo de sinalização necessários para ativar os fatores de transcrição incluindo o fator citoplasmáticos regulador de interferon 3 (IRF3) e o fator nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B). No outro lado, a ativação endossomal de TLR3 facilita o recrutamento do adaptador TRIF, o que permite o recrutamento de moléculas de sinalização, tais como IKKS que fosforilam IRF3 ou NF- $\kappa$ B (Adaptado de GUERRERO, ACOSTA, 2016).

## 2.15 TRANSMISSÃO

A transmissão dos RV ocorre principalmente pela via fecal oral, através da ingestão de água e alimentos contaminados com fezes ou contato com fômites (ESTES, GREENBERG, 2013). Apenas uma gotícula infectada com esse vírus em uma superfície onde uma criança possa encostar a boca é o suficiente para contaminá-la (GLASS et al. 2006). Nesse sentido, as creches, os asilos e os hospitais são focos de disseminação do vírus.

A excreção assintomática de RV em adultos é um potencial importante na transmissão e perpetuação deste vírus de forma endêmica (ESTES, GREENBERG, 2013), já que as partículas infecciosas podem permanecer por longos períodos (1 a 10 dias) sobre superfícies e em ambientes com pouca umidade (GLEIZES et al., 2006). As partículas virais são relativamente resistentes aos desinfetantes comuns mantendo seu potencial infeccioso por vários meses, em temperaturas entre  $-40^{\circ}\text{C}$  e  $-200^{\circ}\text{C}$  (PARASHAR et al., 2003).

Autores relatam ainda, a possível transmissão dos RV pela via respiratória (GORDON, 1982; COOK et al., 1990; ZHENG et al., 1991), além da veiculação hídrica de partículas infecciosas como um importante e expressivo meio de propagação viral em lugares com saneamento básico deficiente ou inexistente (ESTES, GREENBERG, 2013).

Em modelos experimentais, há relatos de que apenas um vírion pode levar à infecção (GRAHAN et al., 1987), já Glass et al., (2006) postulam que apenas dez partículas virais seriam suficientes para acometer uma criança. Ademais a elevada proporção de portadores assintomáticos contribui para a rápida disseminação do vírus (PARASHAR et al., 2003; GLEIZES et al., 2006).

Algumas pesquisas sustentam o caráter zoonótico das infecções por RV, haja vista as observações da ocorrência de estirpes de RV de animais que compartilham o mesmo antígeno neutralizante com outros provenientes de seres humanos. Além disso,

há registros da ocorrência de amostras de origem animal que naturalmente infectam seres humanos ou que são capazes de formar recombinantes gênicos com cepas de RV humanos (NAKAGOMI, NAKAGOMI, 1991; JAIN et al., 2001; RAHMAN et al., 2003; MARTELLA et al., 2005).

## 2.16 TRATAMENTO

O tratamento das gastroenterites por RV é sintomático, voltado para prevenir e tratar a desidratação, secundária ao processo. Para isto, é indicada a ingestão de líquidos e da terapia de reidratação oral (TRO), que também corrigem o déficit hidroeletrólítico existente assegurando um aporte adequado de eletrólitos frente às perdas causadas pelo vômito e a diarreia. No Brasil, o uso rotineiro da reidratação oral, preconizada pela Organização Mundial de Saúde, tem sido prática e eficaz no combate à diarreia aguda e de ampla aceitação (LINHARES, 2000). Em casos de incapacidade quanto à ingestão de líquidos pela via oral ou desidratação grave, será necessária internação hospitalar para hidratação intravenosa e aporte médico (SANTOSHAM, et al., 1997). Infelizmente, a cobertura conhecida para intervenções eficazes como a TRO é inferior a 35% em partes da África e Sul da Ásia (SANTOSHAM, 2010).

No que diz respeito à alimentação rotineira da criança, esta deve ser continuada com o intuito de manter a ingestão de nutrientes necessários ao seu desenvolvimento e evitar a perda de peso no decorrer da infecção. A suplementação de  $Zn^{++}$  no decorrer da doença diarreica é indicada por alguns autores que têm demonstrado que essa atitude ajuda na redução do episódio diarreico, gravidade e incidência de episódios subsequentes nos 2-3 meses seguintes à terapia (OMS, 2005).

Estudos têm postulado ação terapêutica na diarreia por RV, usando uma combinação de *Lactobacillus rhamnosus* GG, reconhecido como probióticos (PANT et al., 2007).

A utilização de constipantes (Caolin, pectina, colestiramina) e de antiespasmódicos não é recomendada pela OMS, pois não atuam na eliminação da doença, nem na melhora do quadro clínico (OMS, 2005). A nitazoxanida<sup>®</sup> vem sendo avaliada quanto à possibilidade de ser utilizada no tratamento de doença diarreica por RVA. Entretanto, os resultados obtidos com esse medicamento ainda são mínimos, necessitando de maiores investigações. O rececadotril<sup>®</sup> é uma droga antissecretora que

atuaria na redução do número de episódios diarreicos, entretanto este só foi avaliado em adultos (CEZSARD, SALAZAR-LINDO, 2005).

Estudos recentes tem demonstrado que a utilização de N-acetilcisteína (NAC) vem sendo usada como ferramenta terapêutica para o tratamento de infecções por RVA em crianças. A administração de NAC após o primeiro episódio diarreico reduziu o número de evacuações, a excreção de antígenos nas fezes e a resolução dos sintomas após dois dias de tratamento. O fato do RV induzir ao estresse oxidativo e a sinalização inflamatória ofereceu uma oportunidade para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas nas infecções por RV como a utilização Agonistas de Receptores Gama ativados por Peroxissoma (PPAR) e anti-inflamatórios não esteroidais (AINES). A indometacina, inibidora da COX foi mostrado como redutora significativa da infecção por RV cepa Wa em células Caco-2 (GUERRERO et al., 2014).

Recentemente, plantas medicinais brasileiras foram testadas e apresentaram atividade antiviral relevante contra infecção por RVA. Entre as espécies estudadas estão a *Byrsonima verbascifolia*, *Eugenia dysenterica*, *Hymenaea courbaril* e *Myracrodruon urundeuva* (CECILIO et al., 2012).

Estudo utilizando abordagens computacionais propuseram que a planta *Rhizophora mucronata Lamk* pode ser eficaz contra a infecção por RVA (HOSSAIN et al., 2016). A planta *Achyrocline bogotensis* que tradicionalmente é utilizada para tratar infecções de pele, respiratórias e do trato urinário foi identificada com substâncias apresentando atividade antiviral in vitro contra o RV e astrovírus (TÉLLEZ et al., 2015).

## 2.17 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

Os elevados índices de morbi-mortalidade gerados pelos RV levaram ao desenvolvimento de pesquisas que culminaram com técnicas rápidas e seguras para o diagnóstico de RV, hoje amplamente difundidas na elucidação de quadros suspeitos, no monitoramento de cepas circulantes e na identificação e classificação de novos genótipos.

A microscopia eletrônica (ME), usada como método pioneiro no diagnóstico de RV, permite a visualização das partículas virais nas fezes, apresenta elevada especificidade na fase aguda da doença e rapidez de diagnóstico. Entretanto, é uma técnica com custos de execução elevados, exige equipe qualificada e não permite

diagnóstico em larga escala, sendo desta forma pouco utilizada (CARTER, 2005; CLARK et al., 2003).

A propagação do vírus em cultura celular é possível, utilizando linhagens celulares como células de rim de macaco (MA-104) e célula de carcinoma de cólon humano (CaCo-2). Entretanto, a propagação do vírus em cultura é muito lenta e não tem valor diagnóstico (SANTOS et al., 2003).

O ensaio imunoenzimático (ELISA ou EIA) é o método mais amplamente utilizado para o diagnóstico laboratorial. É uma técnica voltada para detecção de antígenos virais nos espécimes clínicos e que permitem a detecção do vírus em um maior número de amostras e em um curto intervalo de tempo, além de apresentar uma boa sensibilidade, muito embora necessite de  $10^4$ - $10^7$  partículas virais para detectar a infecção (ESTES, GREENBERG, 2013; ANDERSON, WEBER, 2004). Geralmente, os kits diagnósticos incluem anticorpos policlonais ou monoclonais dirigidos ao antígeno comum VP6 dos RVA. Embora haja testes imunoenzimáticos para a detecção de RVB e RVC, estes somente são utilizados em alguns centros diagnósticos.

O teste de aglutinação em látex é muito utilizado em hospitais por apresentar um baixo custo, praticidade e rapidez. Baseia-se no agrupamento de antígenos livres os quais se ligam a anticorpos específicos, os quais se destinam à determinação qualitativa direta de antígenos virais de RV em fezes (SANTOS et al., 2008). Os testes de imunocromatografia também se baseiam na detecção qualitativa de antígenos virais em amostras de fezes. Esses métodos diagnósticos possuem sensibilidade comparável à da técnica imunoenzimática, além de ser um método rápido, e que não exige grandes aparatos laboratoriais.

A eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) é um método muito utilizado por sua sensibilidade e especificidade na detecção do genoma viral de acordo com os padrões de migração de seus segmentos genômicos. É uma técnica que permite detectar todos os grupos de RV (ESTES, GREENBERG, 2013), além de identificar perfis genômicos e padrões de migração de todos os grupos de RV, o que permite avaliar a diversidade do RV circulantes.

Técnicas moleculares foram desenvolvidas e muito difundidas nos últimos anos, sendo introduzidas na rotina dos laboratórios de pesquisa, porém não naqueles que visam estritamente ao diagnóstico. A reação em cadeia pela polimerase precedida da transcrição reversa (RT-PCR) é uma técnica de amplificação do RNA viral que é inicialmente convertido em cDNA por transcrição reversa, antes de iniciar o processo de

amplificação. A RT-PCR é sem dúvida uma das mais utilizadas na atualidade por apresentar elevada sensibilidade, custo razoável e possibilita a genotipagem dos RV (FISCHER, GENTSCH, 2004; ITURRIZA-GOMARA et al., 2004). Uma variação dessa técnica é a PCR quantitativa, a qual apresenta maior sensibilidade e permite a quantificação da carga viral em uma infecção, bem como a PRC multiplex para o diagnóstico diferencial de infecções virais por vários patógenos (LIU et al., 2011).

Outras técnicas, ainda restritas ao campo científico, também têm sido muito utilizadas, tais como: hibridização, *dot blot*. Nesta técnica, a sequência alvo é separada por eletroforese, transferida para uma membrana e hibridizada com uma sonda marcada com radioisótopos ou enzima. A hibridização em microarranjos consiste na hibridização de amostras de DNA com sequências gênicas específicas imobilizadas em superfícies sólidas. O sequenciamento de nucleotídeos é utilizado para a análise genética do RV (CORTESE, 2010).

## 2.18 IMUNIZANTES CONTRA ROTAVÍRUS

O desenvolvimento de novas vacinas eficazes e seguras contra o RVA, foi reconhecido como a estratégia de intervenção mais eficaz, podendo trazer um resultado significativo sobre o impacto da doença (ORYAN, LINHARES, 2009).

A primeira vacina contra o RV foi desenvolvida nos anos 80, fundamentada na abordagem Jeneriana, usando vírus antígenicamente relacionado a um hospedeiro animal. Esta abordagem se baseava em estudos que indicavam que o RV de animais e humanos compartilhavam antígenos comuns e que animais imunizados com cepas de RV de outros animais apresentavam baixo risco para a doença e para a replicação viral quando desafiados com RV humano. Durante fases de teste desta vacina, foi detectada uma grande variabilidade viral e que esta vacina não era eficaz, sendo esta pouco utilizada (KAPIKIAN et al 1986; TANAKA et al., 2006).

Os primeiros ensaios com vacinas foram realizadas utilizando a RIT 4237, uma cepa bovina G6P[1] (VESIKARI et al 1983). Esta vacina se mostrou segura e eficaz na Finlândia, mostrando eficácia protetora de 80% contra a doença grave por RV (VESIKARI et al, 1985). No entanto, estudos posteriores nos países em desenvolvimento foram decepcionantes, mostrando pouca ou nenhuma eficácia, provocando assim a cessação de estudos com esta vacina (HANLON et al 1987; LANATA et al 1989).



Posteriormente, estudos iniciais com a WC3, uma cepa de RV bovino G6P[5], apresentou esta como uma promissora candidata à vacina (CLARK et al 1988). No entanto, subsequentes ensaios não mostraram proteção significativa (BERNSTEIN et al 1990), com esta candidata levando encerramento dos estudos com esta vacina. Em uma tentativa de fazer a vacina WC3 mais sorotipicamente relacionada com cepas humanas, foram introduzidas por rearranjo os genes que codificam as proteínas de neutralização, VP4 e VP7 de rotavírus humano. Este método foi denominado abordagem Jenneriana modificada (Flores e Kapikian, 1990), e resultou no desenvolvimento da vacina pentavalente RotaTeq<sup>TM</sup>, uma das vacinas contra o rotavírus licenciada em vários países atualmente.

A vacina de rotavírus símio denominado de Rhesus (RRV) foi também uma das primeiras candidatas a vacina, mas a proteção induzida por ela foi inconsistente (FLORES et al 1987; VESIKARI et al 1990; SANTOSHAM et al 1991; MADORE et al 1992; PADILLA-NORIEGA et al 1992) devido o maior índice de proteção ser oferecido contra a infecção pela cepa vacinal (G3P[3]). Para resolver este problema, foi feito o rearranjo da RRV com a incorporação de genes de cepas humanas de outros três sorotipos dominantes G (G1, G2 e G4), assim criando a vacina tetravalente Rotashield<sup>TM</sup>. Esta vacina foi licenciada e incorporada no EUA em 1998, mas foi retirada por seu fabricante em 1999, após a descoberta de um pequeno, mas aumento significativo em intussuscepção em vacinados durante vigilância pós-licenciamento (MURPHY et al 2003).

Numerosos estudos têm documentado que a imunidade induzida por uma infecção natural pelo RVA protege as crianças de subsequentes episódios de diarreia grave por esse patógeno, embora este apresente tipos distintos (VELÁSQUEZ et al., 1996). Baseado nesses conhecimentos foram desenvolvidas várias estratégias para a produção de vacinas contra RVA e algumas avaliadas em seres humanos. No ano de 2009 a Organização Mundial de saúde (OMS) recomendou a inclusão das vacinas licenciadas Rotarix e Rotateq no Programa Nacional de Imunização (PNI) de países onde demonstrou ter significativo impacto na saúde pública (WHO, 2009). Após essa recomendação vários países que introduziram a vacina contra rotavírus no programa de imunização nacional (figura 13).

Atualmente, existem duas vacinas licenciadas e recomendadas pela OMS que se mostraram seguras e eficientes são elas, a Rotarix<sup>®</sup> produzida pela GSK que é monovalente e derivada de uma amostra de RVA humana, G1[P8] e a Rotateq<sup>®</sup>

(MERCK), construída a partir do protótipo viral WC3, de origem bovina, reestruturada com cepas de origem humana, formando assim, o imunizante pentavalente de origem bovino-humano, que confere imunidade contra os genótipos mais prevalentes de RVA que são G1, G2, G3, G4 e P[8].

Em 2000-2001, a China introduziu em seu Programa Nacional de Imunização a vacina oral LLR (atenuada, G10P[12]), derivado do isolado cordeiro RVA. No entanto, a eficácia desta vacina é desconhecida uma vez que não foi testada contra placebo em testes clínicos fase III. A Rotavac® (monovalente oral G9P [11] (11E6)), uma nova vacina RVA oral foi lançada na Índia, em 2014, e licenciada até o momento, exclusivamente neste país (BHANDARI et al., 2014).

No Brasil, aproximadamente 36 estudos desenvolvidos no período pré-vacina demonstraram que o RVA foi responsável por 4,5-44% dos casos de diarreia aguda entre os pacientes internados ou não (CDC 2009).

Ambas as vacinas demonstraram segurança, eficácia e proteção em grandes estudos clínicos pré e pós-licenciamento realizados na Europa, Estados Unidos e América Latina (RUIZ-PALACIOS et al., 2006; ARAÚJO et al., 2007; VESIKARI et al., 2007), apresentando taxas de proteção que variaram de 70 a 90% em países desenvolvidos (PATEL, PARASHAR, 2009; BOOM et al., 2010; VESIKARI et al., 2010; ANDERSON et al., 2011; BUTTERY et al., 2011; GIAQUINTO et al., 2011; JUSTINO et al., 2011; QUINTANAR-SOLARES et al., 2011; TATE et al., 2011; TREGNAGHI et al., 2011; DESAI et al., 2012; CORTESE et al., 2013; GASTÃNADUY et al., 2013; PAYNE et al., 2013; LESHEM et al., 2014; RHA et al., 2014). Tal ação refletiu em significativas reduções nos índices de internação e mortalidade associado ao RVA (RICHARDSON et al., 2010; GASTÃNADUY et al., 2013). Por outro lado em países de renda média e baixa, como Nicarágua, Malawi, África do Sul, Quênia e Bangladesh a eficácia da vacinação foi baixa, com cerca de 20 a 30% (ARMAH et al., 2010; MADHI et al., 2010; ZAMAN et al., 2010).

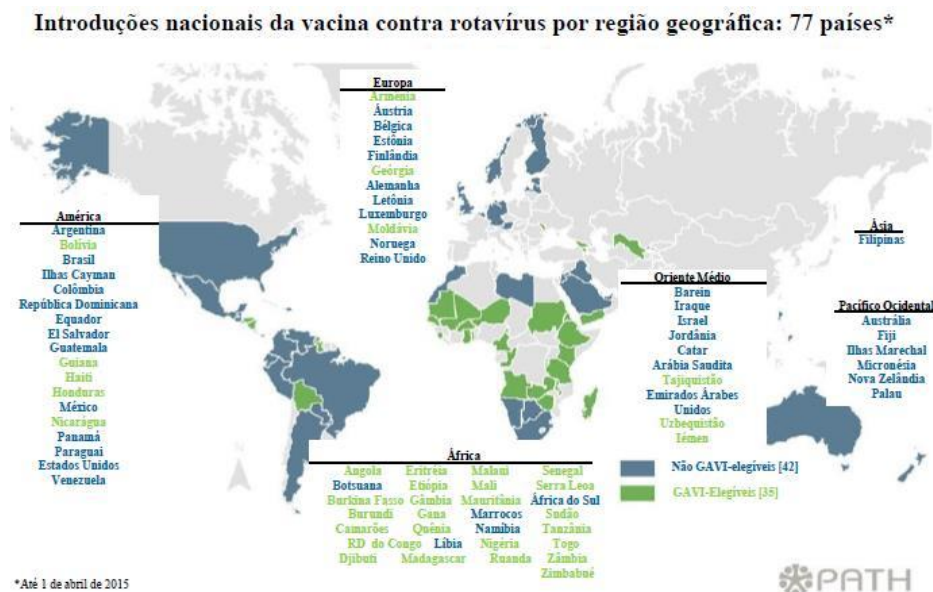


Figura 13: Países que introduziram a vacina contra rotavírus no programa de imunização nacional. Adaptado de PATH (2015).

A implantação de vacinas contra o RVA mostraram uma consistente proteção contra as hospitalizações relacionadas com diarreia na América Latina e Caribe. Os resultados foram mais satisfatórios para a Rotarix. A Eficácia foi maior entre as crianças menores de 12 meses e menor em crianças mais velhas (DE OLIVEIRA et al., 2015). Luchs et al., (2015) identificaram em seu estudo uma redução na detecção laboratorial de rotavírus para 19,5 % em crianças menores de 5 anos após a introdução da vacina no Brasil.

Estima-se que no período de 2007 a 2025, a vacinação universal contra o RV possa evitar 141 visitas médicas para cada 1000 crianças vacinadas na América Latina e salvar mais de 16.000 vidas (ATHERLY et al., 2009).

Matthijnsens et al. (2014) afirmam que embora a Rotarix seja altamente eficaz na proteção contra as infecções por RVA tipo G2P[4], a proporção de G2P[4] associado aos casos de gastroenterite é superior em vacinados do que em não vacinados. Outros autores não encontraram diferenças significativas da proteção conferida pela vacina frente a algum genótipo específico (DENNEHY, 2013; HEMMING, VESIKARI, 2013; DONATO et al, 2014; PELÁEZ-CARVAJAL et al, 2014).

Guerra et al. (2015), em um estudo pós comercialização da vacina evidencia que o tipo G2P[4] de RVA foi detectado como o mais predominante nos 20 primeiros meses do estudo, seguido por G1P[8], o que é sugestivo de uma flutuação natural do genótipo e não a uma possível pressão seletiva da vacina.

Recente meta análise realizada na América Latina evidenciou a efetividade da vacina em 53% contra infecções por RV, 73% contra hospitalizações relacionadas ao Rv e 74% contra episódios graves de diarreia. Este estudo destaca as reduções significativas das hospitalizações e mortes, além de redução de episódios de diarreia devido ao RVA entre os países que adotaram a vacinação contra o Rotavírus (SANTOS et al., 2016).

Devido à elevada eficácia dos programas de vacinação contra o RVA, este deixou de ser a principal causa de internação em crianças (HEMMING et al., 2013; KOO et al., 2013; PAYNE et al., 2013; BUCARDO et al., 2014). Desta forma, informações sobre a efetividade da vacinação contra o RVA são de extrema importância, além da continuidade dos programas de vigilância de cepas seguidos pela caracterização genética das mesmas.

### 3 JUSTIFICATIVA

Estudos apontam que o genótipo G2 reemergiu no Brasil em 2005 e tornou-se o mais prevalente a partir de 2006, mesmo após a introdução da vacina contra o RVA no calendário nacional de vacinação, seguindo por um declínio, porém não desaparecimento, a partir de 2013. O fato deste genótipo ter infectado tantas crianças, mesmo após a introdução da vacina levantou muitos questionamentos quanto à proteção conferida pela vacina frente a este genótipo. Além disto, o fato deste tipo ter apresentado elevada ocorrência em países onde não houve a introdução da vacina contra o RVA, e também pelo fato de ter ocorrido de forma proporcional em crianças vacinadas e não vacinadas levantaram a hipótese de uma flutuação natural deste genótipo (MONTENEGRO et al., 2015).

Em escala global e principalmente no Brasil, estudos evidenciaram nos últimos anos a reemergência do genótipo G2 e uma modificação no seu perfil epidemiológico. Este genótipo geralmente era detectado associado a surtos envolvendo crianças e adultos e segundo alguns autores, podendo ocorrer de forma cíclica a intervalos de dez anos (LINHARES, VELÁZQUEZ, 2008).

Esta pesquisa é a extensão de um estudo conduzido na região Norte do Brasil de abordagem genética das proteínas VP7 e VP4 de amostras de RV G2 que circularam nessa região ao longo de 16 anos e que evidenciou a ocorrência de mutações em regiões importantes da proteína VP7, assim como a diferenciação nas linhagens circulantes no período anterior e posterior à introdução da vacina, evidenciado pela alternância na circulação das linhagens e sublinhagens desta proteína.

Neste contexto, ainda persistem múltiplos aspectos sobre a infecção causada pelo genótipo G2 não suficientemente elucidados. Portanto, esse estudo é pioneiro ao investigar as possíveis mudanças em todas as proteínas do genótipo G2 que possam ter levado à predominância deste tipo por um longo período após a implantação da vacina no país, além de um entendimento sobre a distribuição temporal e a diversidade genética do genótipo G2 ao longo dos últimos 20 anos na região amazônica.

## **4 OBJETIVOS**

### **4.1 OBJETIVO GERAL**

Estabelecer a distribuição temporal do genótipo G2 ao longo de 33 anos na região Norte em amostras de crianças do período anterior e posterior à introdução da vacina contra o RVA.

### **4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- a) Determinar os genótipos circulantes dos nove genes de RV G2 detectados ao longo de 20 anos na região norte do Brasil;
- b) Verificar a distribuição temporal das variantes genéticas de RVA antes e após a introdução da vacina;
- c) Verificar as variações intra-genotípicas nas amostras G2 antes e após a introdução da vacina contra RVA no Brasil.
- d) Construir a árvore das relações filogenéticas para os genes estruturais e não estruturais do RVA genótipo G2.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Aspectos éticos e de biossegurança

Este estudo foi submetido à Plataforma Brasil visando a análise junto ao Comitê de Ética em Pesquisa Humana do Instituto Evandro Chagas/SVS/MS. O presente estudo dispensou o uso do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), uma vez que utilizou do ácido nucleico viral previamente extraído das amostras coletadas nos anos de ocorrência dos estudos envolvidos, não ofereceu risco aos pacientes, haja vista que não ter havido uso dos dados clínico-epidemiológicos dos pacientes, além do desconhecimento da identificação do mesmo. A carta de aprovação do referido estudo encontra-se no anexo 1.

Todas as etapas de processamento do material foram desenvolvidas dentro das normas de biossegurança vigentes, a fim de minimizar a exposição dos pesquisadores e da equipe técnica a qualquer tipo de risco biológico.

### 5.2 População do estudo

Devido à inexistência de ácido nucleico de amostras de todo o período do estudo, a população alvo foi dividida em dois momentos: foram utilizados inicialmente dados de detecção de cepas de rotavírus que circularam no período de 1981 a 2012 em Belém do Pará com a finalidade de estimarmos as variações das cepas circulantes nesse período. Para o período de 1993 a 2012, foi utilizado o ácido nucleico de crianças que apresentaram diarreia aguda, em âmbito ambulatorial ou hospitalar na região norte do Brasil.

Os ácidos nucleicos analisados no presente projeto foram provenientes de estudos desenvolvidos no Instituto Evandro Chagas (IEC) e conduzidos no período de 1992 a 1994 (Projeto Nosocomial), 1998 a 2000 (Projeto Hospital Sentinela), 2006 a 2012 (Projeto Rede de Vigilância de Rotavírus) e 2008 a 2012 (Projeto Rotavírus Efetividade).

Todos os ácidos nucleicos selecionadas para o presente estudo foram previamente caracterizados como genótipo G2 por meio das técnicas de reação em cadeia mediada pela polimerase precedida de transcrição reversa e posteriormente por Nested-PCR (DAS et al., 1994; GOUVEA et al., 1990) no período de vigência dos estudos envolvidos.

O critério de inclusão das amostras selecionadas para o estudo foi com base na quantidade suficiente de ácido nucleico disponível e viabilidade deste para as análises.

Tabela 1: Amostras analisadas neste estudo, de acordo com o ano de coleta tipo de estudo e Estado de origem.

Amostra	Característica do estudo	Estado	Ano
RVA/Human-wt/BRA/NSC105-PA/1993/G2P[4]	Hospitalar		1993
RVA/Human-wt/BRA/NSC082-PA/1993/G2P[4]			
RVA/Human-wt/BRA/NSC206-PA/1993/G2P[4]			
RVA/Human-wt/BRA/NSC314-PA/1994/G2P[4]			1994
RVA/Human-wt/BRA/HSP187-PA/1997/G2P[4]	Ambulatorial e hospitalar		1997
RVA/Human-wt/BRA/HST030-PA/1998/G2P[4]			
RVA/Human-wt/BRA/HST181-PA/1999/G2P[4]			
RVA/Human-wt/BRA/HST001-PA/1998/G2P[4]			1998
RVA/Human-wt/BRA/HST369-PA/1999/G2P[4]	Ambulatorial	Pará	1999
RVA/Human-wt/BRA/RV24751-PA/2006/G2P[4]			
RVA/Human-wt/BRA/RV96895-PA/2006/G2P[4]			
RVA/Human-wt/BRA/RV96877-PA/2007/G2P[4]			2006
RVA/Human-wt/BR/ RV97064-PA/2007/G2P[4]	Ambulatorial e hospitalar		2007
RVA/Human-wt/BRA/RV105658-PA/2008/G2P[4]			
RVA/Human-wt/BRA/1A0174-PA/2008/G2P[4]			
RVA/Human-wt/BRA/1A0028-PA/2008/G2P[4]			2008
RVA/Human-wt/BR/1A0808/PA/2008/G2P[4]	Ambulatorial		2009
RVA/Human-wt/BRA/2A2300-PA/2009/G2P[4]			
RVA/Human-wt/BR/1A1852/PA/2009/G2P[4]			
RVA/Human-wt/BRA/RV105657-PA/2009/G2P[4]			2009
RVA/Human-wt/BR/2A3463/PA/2010/G2P[4]	Ambulatorial e hospitalar		2010
RVA/Human-wt/BRA/1A3158-PA/2010/G2P[4]			
RVA/Human-wt/BRA/RV114210-PA/2010/G2P[4]	Ambulatorial	Amazonas	2007
RVA/Human-wt/BRA/RV114215-PA/2010/G2P[4]			
RVA/Human-wt/BRA/RV98321-AM/2007/G2P[4]			2007
RVA/Human-wt/BR/RV97717/AM/2007/G2P[4]			
RVA/Human-wt/BRA/RV99932-AM/2008/G2P[4]			
RVA/Human-wt/BRA/RV115156-AM/2011/G2P[4]			2008
RVA/Human-wt/BRA/RV44-AM/2012/G2P[4]	Acre		2011
RVA/Human-wt/BRA/RV111830-AC/2009/G2P[4]			
RVA/Human-wt/BRA/RV111823-AC/2009/G2P[4]			
RVA/Human-wt/BRA/RV113425-AC/2010/G2P[4]			2012
RVA/Human-wt/BR/RV115036/AC/2011/G2P[4]			2009
RVA/Human-wt/BRA/RV117236-AC/2012/G2P[4]			
RVA/Human-wt/BRA/RV105665-AP/2009/G2P[4]			
RVA/Human-wt/BRA/RV97707-RR/2006/G2P[4]			2009
RVA/Human-wt/BRA/RV96876-RR/2007/G2P[4]	Roraima		2006
RVA/Human-wt/BRA/RV100104-RR/2008/G2P[4]			
RVA/Human-wt/BRA/RV109743-RR/2010/G2P[4]			
RVA/Human-wt/BRA/RV115018-RR/2011/G2P[4]			
			2007
			2008
			2010
			2011

### 5.3 Métodos

A seção de “Metodos” deste manuscrito de tese será apresentada sob a forma de artigos, aceito e submetido para publicação.



## **6 RESULTADOS**

Os resultados serão apresentados na forma de dois artigos, um artigo já foi aceito e o outro está submetido e em fase de adequações.

6.1 ARTIGO 1 : Distribuição de sorotipos de RVA na região Norte do Brasil ao longo de 27 anos, no período pré e pós vacina.



## Review Article

## Rotavirus serotype distribution in northern Brazil trends over a 27 year period pre and post national vaccine introduction

Alessilva Oliveira<sup>a</sup>, Joana D'Arc P. Mascarenhas<sup>a</sup>, Luana S. Soares<sup>a</sup>, Sylvia F.S. Guerra<sup>a</sup>, Yvone B. Gabbay<sup>a</sup>, Nervo Sánchez<sup>b</sup>, Romulo E. Colindres<sup>b</sup>, Maria Cleonice A. Justino<sup>a</sup>, Alexandre C. Linhares<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Instituto Evandro Chagas, Secretaria de Vigilância em Saúde, Virology Section, Avenida Almirante Barroso, 492, 66.090-000 Belém, Pará, Brazil

<sup>b</sup>GlaxoSmithKline Biologicals, estrada dos Bandeirantes 8464, 22.783-110 Jacarepaguá, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 28 October 2011

Received in revised form 16 December 2011

Accepted 21 December 2011

## Keywords:

Rotavirus strains

Genotypes

Gastroenteritis

National vaccine

North Brazil

Serotype

## ABSTRACT

In Brazil, a rotavirus vaccine was included in the public sector in March 2006. In order to identify a possible effect of vaccination on rotavirus strains we evaluated the distribution of serotypes/genotypes in northern Brazil during pre (1981–2005) and early post (2006–2008) national rotavirus vaccine introduction periods. Of 1286 rotavirus strains, 993 (77.2%) were successfully G typed. G1 strains were detected throughout the years, accounting for the majority of typed isolates ( $n = 426$ ; 42.9%). G2 rotaviruses displayed a cyclic pattern of occurrence over time, re-emerging recently in early 2006, with detection rates as high as 91%, and remained the predominant circulating strain through 2008. G9 rotaviruses appeared during 1990–1992, re-emerged from 1998 to 2000 and rose to 43% in a gastroenteritis outbreak in north-western Brazil in 2005. The most common combinations overall were G2P[4] (55.1%; 136/247), and G1P[8] (24.7%; 61/247). Although our data show the predominance of G2P[4] early after vaccine introduction, there is a need for continuous, long-term surveillance of circulating strains to better assess a possible effect of rotavirus vaccination on the strain ecology.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## Contents

1. Introduction	00
2. Material and methods	00
3. Results	00
4. Discussion	00
Conflict of interest	00
Role of funding source	00
Trademarks	00
Acknowledgements	00
References	00

**Abbreviations:** UMV, Universal Mass Vaccination; MoH, Ministry of Health; PCR, polymerase chain reaction; RT-PCR, reverse transcription polymerase chain reaction; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; ST, G serotyping.

\* Corresponding author. Address: Instituto Evandro Chagas, Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, Avenida Almirante Barroso, 492, 66.090-000 Belém, Pará, Brazil. Tel.: +55 91 3214 2007x2002; fax: +55 91 3214 2005.

**E-mail addresses:** [alessilvaoliveira@iec.pa.gov.br](mailto:alessilvaoliveira@iec.pa.gov.br) (A. Oliveira), [joanamascarenhas@iec.pa.gov.br](mailto:joanamascarenhas@iec.pa.gov.br) (J.D.P. Mascarenhas), [luanasoares@iec.pa.gov.br](mailto:luanasoares@iec.pa.gov.br) (L.S. Soares), [sylviaguerra@iec.pa.gov.br](mailto:sylviaguerra@iec.pa.gov.br) (S.F.S. Guerra), [yvonegabbay@iec.pa.gov.br](mailto:yvonegabbay@iec.pa.gov.br) (Y.B. Gabbay), [nervo.o.sanchez@gsk.com](mailto:nervo.o.sanchez@gsk.com) (N. Sánchez), [romulo.e.colindres@gskbio.com](mailto:romulo.e.colindres@gskbio.com) (R.E. Colindres), [mariajustino@iec.pa.gov.br](mailto:mariajustino@iec.pa.gov.br) (M.C.A. Justino), [alexandrelinhares@iec.pa.gov.br](mailto:alexandrelinhares@iec.pa.gov.br) (A.C. Linhares).

1879-4378/\$ - see front matter © 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.  
doi:10.1016/j.trivac.2011.12.002

## 1. Introduction

Rotavirus remains the most common cause of severe acute gastroenteritis in infants and young children worldwide, being responsible for an estimated 527,000 deaths annually. Parashar et al. [1] have estimated that 82% of these deaths occur in children in the less developed regions of the world, where a rotavirus vaccine is most needed.

Currently, there are two licensed oral live attenuated rotavirus vaccines, *Rotarix*<sup>TM</sup> (GlaxoSmithKline, Rixensart, Belgium) and *Rotateq*<sup>TM</sup> (Merck Research Laboratories, USA). In large, phase III

trials in Latin America, Europe and the United States these two vaccines proved to be safe and have demonstrated excellent protection (>85%) against severe rotavirus disease [2,3].

*Rotarix*<sup>TM</sup> and *Rotateq*<sup>TM</sup> have been pre-qualified by WHO and are increasingly being introduced in national immunization programs of many countries worldwide, mainly in those regions where successful phase III efficacy trials had been conducted [4]. In this context, Brazil was one of the first countries to introduce universal immunization in March 2006 with *Rotarix*<sup>TM</sup>. Brazil is also the largest country to introduce *Rotarix*<sup>TM</sup> into Universal Mass Vaccination (UMV), covering a birth cohort of 3.3 million. According to the Brazilian Ministry of Health [5], since the introduction of nation-wide rotavirus vaccination it has been observed an increase in the uptake of vaccine over time, with 81% of children having had two doses of the vaccine by 2008. However, the coverage rates of the second dose remain suboptimal in the Northern region, ranging from 27% to 65% in 2006 and 2008, respectively.

Of importance, trials recently completed in Africa and Asia have provided evidence that both vaccines are quite beneficial in poor settings and this warranted a further WHO global recommendation to include rotavirus vaccines in every nation's immunization program [6–9].

While *Rotarix*<sup>TM</sup> (monovalent; G1P[8]) and *Rotateq*<sup>TM</sup> (pentavalent; G1, G2, G3, G4 and P[8]) differ in strain composition, both vaccines appear to provide significant protection against a variety of rotavirus strains [10,11]. Nevertheless, a continuous monitoring of circulating rotavirus strains is needed to detect the possible emergence of uncommon or novel types in the community that may pose a challenge to the efficacy of the available vaccines [4].

Although recent recommendations have been proposed for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments, currently a system exists for the dual classification of serotype specificities are based mainly on the segregation of VP4 (protease-sensitive; P types) and VP7 (glycoproteins; G types) genes [12]. Based on the diversity of VP4 and VP7 proteins present on the outer shell, rotaviruses are classified into 23 G and 31P types [13]. Currently, the most common strains in human disease belong to G1, G2, G3, G4, and G9 types in combination with either P[4], P[6] or P[8] types [14]. Several studies have reported that approximately 90% of the human rotavirus strains include G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8], and G9P[8] combinations.

Several serotyping/genotyping studies have been conducted across Brazil during the past two decades, underscoring the broad diversity of circulating strains over time, including the common human rotavirus strains as well as uncommon strains (G5) or globally emerging (G9) types [15]. A number of surveys conducted beginning in early 2006, coinciding with the year that the vaccine was introduced, indicate an apparent predominance of G2P[4] strains in northern, northeastern and southeastern regions of Brazil [16–19] and led to speculation that the vaccine was causing strain replacement [20].

This review assesses the diversity of rotavirus strains in northern region of Brazil between 1981 and 2008, highlighting the distribution profiles of circulating serotypes/genotypes before and early after introduction of *Rotarix*<sup>TM</sup> into the national immunization program. The patterns of genotype distribution over time provided us with the opportunity of an early insight on the issue of whether changes following introduction of universal rotavirus vaccination in Brazil might be due to natural fluctuation or possible vaccine pressure.

## 2. Material and methods

We reviewed data from 11 studies assessing diarrhoea burden in children and adults, conducted between 1981 and 2006 in

northern Brazil [21–28]. In addition, a review was made using specifically data from the Brazilian Ministry of Health's (MoH) surveillance network, established in February 2006. This national, hospital-based surveillance was part of a program implemented by Pan American Health Organization in Latin American and Caribbean countries to assess the burden of rotavirus disease and monitoring circulating strains in the pre-vaccine era. While samples from the 11 studies were obtained from the states of Pará ( $n = 10$ ) and Maranhão ( $n = 1$ ), the official MoH's network included seven states located in the Amazonian region of Brazil-Acre, Amazonas, Roraima, Pará, Amapá, Maranhão and Tocantins (Table 1). Overall, there were nine hospital-based studies, one community-based study and two vaccine trials comprising variable age groups: 0–3 years (3 studies), 0–5 years (2), 0–2 years (1), 0–28 days (1), 1 month–2 years (1), 2 months–1 year (2), 1 month–29 years (1), and 0–55 years (1). The surveillance network implemented by the MoH included diarrhoeic children of  $\leq 5$  years.

Stool specimens were obtained as soon as possible after an episode of diarrhoea was detected. An aliquot of each sample was stored at 2–8 °C for a maximum of 24 h until being transported on ice to Instituto Evandro Chagas, a MoH's Rotavirus National Reference Centre. All samples were screened for the presence of group A rotaviruses by commercially available enzyme-linked immunosorbent assays (Dakopatts, Denmark or Rotaclone, USA). Serotyping/genotyping was performed using monoclonal antibodies, solid phase immuno-electron microscopy or reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), depending on the techniques available during the conduct of each study over time. In order to assess the RNA electrophoretic profiles, polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) was carried out on selected faecal suspensions using a standard method which includes extraction of nucleic acid by using glass powder. G serotyping (ST) using monoclonal antibodies was performed in five studies; ST and solid-phase immune electron microscope in one, ST and RT-PCR genotyping (GT) in 2, and GT only in 4. Samples from the MoH's surveillance network were genotyped only by PCR.

## 3. Results

Of the 1286 stool specimens that yielded group A rotavirus antigen positive result by ELISA, a G serotype could be assigned to 993 (77.2%). These isolates (either single or mixed) comprised the five globally relevant G serotypes, that is, G1, G2, G3, G4 and G9, which make up the majority of strains associated with gastroenteritis in humans. The predominant G serotypes detected from 1981 to 2008 were G1 (426; 43.0%), followed by G2 (337; 33.9%), G9 (142; 14.3%), G4 (45; 4.5%) and G3 (15; 1.5%). In addition, 28 (2.8%) rotavirus strains had mixed serotype-specificities (Fig. 1).

G1 strains were identified throughout the years, being the predominant serotype detected in 6 out of the 11 periods of observation of each study, at prevalence rates that ranged from 24.6% to 66.7%. Rotavirus strains bearing G2 type-specificity occurred at rates that varied from 14.8% to 26.3% during studies conducted during 1981–1990, 1982–1986, and 1990–1992 and became predominant in 1992–1994 (76.7%). In the 1998–2000 period G2 types were recognized at a rate comparable to that of G1 (34.1% and 30.3%, respectively) and this was followed by an abrupt decrease in prevalence rates (0–2.3%) in studies conducted during the following 5 years. G2 then re-emerged as the leading serotype beginning early in 2006 (Study K; just before and a few months after introduction of rotavirus vaccine in Brazil), as well as during the official national surveillance (2006–2008), at rates that ranged from 60.6% to 91.0%.

With the exception of one isolate during a 1990–1992 vaccine trial in Belém, Brazil, G9 could not be recognized in six studies

**Table 1**  
Characteristics of rotavirus studies conducted in northern Brazil during 1981–2008.

Study, short title	Characteristics	Study period	Setting	Age-group	Laboratory method	Reference
(A) National surveillance	Hospital-based	1981–1990	Belém, Brazil	0–5 years	Serotyping	Pereira [21] (1993)
(B) Longitudinal study	Community-based	1982–1986	Belém, Brazil	0–3 years	Serotyping	Linhares [22] (1989)
(C) Hospital-based study	Hospital-based	1988 <sup>a</sup>	Belém, Brazil	1 month–2 years	Serotyping	Linhares [23] (1993)
(D) RRV-TV trial	Double-blind placebo-controlled trial	1990–1992	Belém, Brazil	1 month–2 years	Serotyping, SPIEM	Linhares [24] (1996)
(E) Nosocomial/community infection	Hospital-based	1992–1994	Belém, Brazil	0–5 years	Serotyping	Gusmão [25] (1999)
(F) Hospital-based study in São Luís	Hospital-based	1997–1999	São Luís, Maranhão	0–2 years	Serotyping	Luz [26] (2005)
(G) Hospital-based surveillance	Hospital-based	1998–2000	Belém, Brazil	0–3 years	Serotyping/genotyping	Gabbay (personal communication)
(H) Vaccine trial, phase II	Double-blind placebo-controlled trial	2001–2003	Belém, Brazil	2 months–1 year	Genotyping	Salinas [27] (2005)
(I) Pre-trial surveillance	Hospital-based	2003 <sup>b</sup>	Belém, Brazil	0–3 years	Genotyping	Abate [28] (2004)
(J) Outbreak in Rio Branco	Hospital-based	2005 <sup>c</sup>	Rio Branco, Acre	1 month–29 years	Genotyping	Siqueira [41] (2010)
(K) Salobo study	Hospital-based	2006 <sup>d</sup>	Parauapebas, Pa, Brazil	0–55 years	Genotyping	Mascarenhas (personal communication)
(L) Official national surveillance	Hospital-based, outbreaks	2006–2008	Northern, north-eastern	0–5 years	Genotyping	CGLAB*, MoH's database

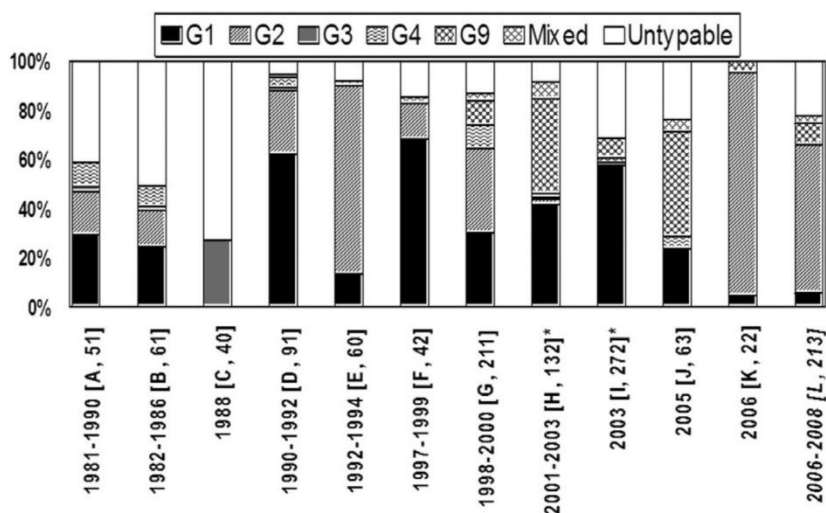
SPIEM: Solid-Phase Immune Electron Microscopy; CGLAB: Coordenação de Laboratórios de Saúde Pública, Ministério da Saúde.

<sup>a</sup> March–September, 1988.

<sup>b</sup> March–September, 2003.

<sup>c</sup> August–September, 2005.

<sup>d</sup> January–September, 2006.



A, National surveillance; B, Longitudinal study; C, Hospital-based study; D, RRV-TV trial; E, Nosocomial/community infection; F, Hospital-based study in São Luís; G, Hospital-based surveillance; H, Rota-006 vaccine trial, phase II\*; I, Rota-203 pre-trial surveillance\*; J, Outbreak in Rio Branco; K, Salobo study; L, Official national rotavirus surveillance  
**Rotavirus vaccine introduced in the public sector in March 2006**  
 \*, GSK-sponsored studies

**Fig. 1.** Occurrence of rotavirus G types in 12 studies and an official Ministry of Health's survey conducted between 1981 and 2008 in northern Brazil. This figure shows the prevalence rates of circulating rotavirus types over time (1981–2008) in 12 studies and the official Ministry of Health's survey carried out in Northern Brazil. Overall, G1 rotavirus serotype was found to be predominant, accounting for 43.0% of isolates.

conducted from 1981 to 1999; it re-emerged during a study carried out from 1998 to 2000 and rose to 42.9% as the predominant serotype during an outbreak of gastroenteritis in north-western Brazil. G3 was the most prevalent type during a hospital-based surveillance for gastroenteritis in 1988. G4 occurred at low prevalence rates (1.5–9.8%) across seven studies conducted between 1981 and 2005.

Table 2 shows the results of 247 samples from five surveys (B, D, F, K, L), as shown in Fig. 1) conducted between 1982 and 2008, which could be both G- and P-typed. The most common combinations were G2P[4] (55.1%; 136 out of 247 samples) and G1P[8] (24.7%; 61/247). While G or P mixed serotypes were identified in 17 (6.7%) rotavirus strains, a G or P type-specificity could not be assigned to 28 (11.3%) samples. The electrophoretic RNA

**Table 2**  
Combination of G and P rotavirus genotypes of 247 samples from 1982 to 2008 in northern Brazil.

G genotype	P genotype					Total
	P[8]	P[4]	P[6]	P mixed	P NT	
G1	55	5	4	6	9	79
G2	1	130	7	2	1	141
G3	0	0	0	0	1	1
G4	0	0	6	0	0	6
G9	5	1	0	0	0	6
G mixed	0	0	1	4	0	5
G NT	0	0	1	0	8	9
Total	61	136	19	12	19	247

profile could be identified in 253 samples from 5 studies (B, D, E, F and L, as shown in Fig. 1). Of these, 155 (61.5%) and 82 (32.5%) specimens displayed “long” and “short” electropherotypes, respectively, with the remainder of samples showing unclear profiles (data not shown).

#### 4. Discussion

The conduct of several surveillance studies and (more recently) vaccine trials in northern Brazil, during almost 3 decades, allowed an assessment of the diversity of rotavirus strains that have circulated over time. One of these trials was conducted during 1990–1992, when a first generation rhesus–human reassortant rotavirus vaccine (RRV-TV, *Rotashield*<sup>TM</sup>) was evaluated for safety, immunogenicity and efficacy in Belém. Altogether these studies have generated a large amount of data on the temporal distribution of rotavirus serotypes/genotypes for the northern region of Brazil, highlighting their circulation profiles before and early after country-wide introduction of rotavirus vaccine.

Overall our findings have shown that the degree of diversity of co-circulating strains was remarkable in northern Brazil during the past 27 years, particularly when considering data from studies conducted between 1981 and 2005 are analyzed. Data showing that rotaviruses bearing VP7 G1 serotype-specificity were the most common strain are consistent with numerous studies reporting worldwide predominance of G1P[8] strains [14]. Furthermore, the overall highest frequency (42.9%) of G1 in our study is similar to the prevalence rates of G1 type for all over Brazil (~43%) reported in two recent reviews by Gurgel et al. [18] and Leite et al. [15]. Both above mentioned reviews covered only a small proportion of the studies from northern Brazil, included in this current review paper.

It should be pointed out that unlike G1 strains, which were detected throughout the review period, rotaviruses belonging to G2 serotype displayed a cyclic pattern of occurrence, as it has been previously documented in Brazil and elsewhere [25,29,30]. A major finding in our study was the remarkable re-emergence (detection rates as high as 91%) of G2 strains during 2006–2008, which likely reflects a continental phenomenon [15]. This remarkable G2P[4] predominance appears indeed to have occurred all over Latin America, even in those countries that had not introduced rotavirus vaccination into their national immunization programs. In support of this, a recent epidemic of G2P[4] related rotavirus gastroenteritis in Honduras (Ferrera et al. [31]), as well as the high incidence rates (68–81%) of G2 strains during surveillance studies in El Salvador, Guatemala, Honduras, Argentina and Paraguay [32–34]. Interestingly, outside Latin America there are also recent reports of increasing detection rates of G2P[4] strains in Bangladesh [15,35].

A recent, post-vaccine licensure surveillance conducted in north-eastern region of Brazil led some investigators to claim that predominance of G2 serotype may be a result of possible vaccine-induced

selective pressure [17]. However, based on previous observations, the current high prevalence of G2 most likely reflects its cyclic pattern of occurrence in Brazil and elsewhere [36]. In a recent study in Recife, Brazil, Nakagomi et al. [20] showed that G2 strains were on increasing trend, since rates were of 7% in 2004–2005 and yielded 47% even at the onset of rotavirus vaccination program. To reinforce this hypothesis, it is known that some south-American countries bordering Brazil (e.g. Argentina and Paraguay), where G2P[4] is currently predominant, have not yet introduced rotavirus vaccine into the public sector. The current issue concerning predominance of G2 strains during early post-vaccine introduction may only be fully elucidated through the development of well-designed post-marketing studies already under way in Belém, Brazil, Panama and El Salvador, to assess both vaccine impact and strain surveillance, in compliance with recent World Health Organization recommendations [4].

The other important finding that has emerged from this analysis is the detection of G9 strains in large numbers, accounting for 14% of typed isolates. In our 27-year analysis of circulating serotypes in northern Brazil, a single G9 isolate was reported in a vaccine trial during 1990–1992, it re-emerged during a hospital-based surveillance from 1998 to 2000 and rose to >40% in late 2005 as the predominant serotype in a gastroenteritis outbreak in north-western Brazil (unpublished data). Of importance, G9 rotaviruses are currently considered emerging pathogens and its emergence as an important serotype in the northern Brazil parallels reported global increases of this ST [14,15,37,38]. Also relevant in regard to this serotype is its reported association with an increased severity of illness, with outbreaks occurring in multiple settings [39,40]. Conditions similar to these were recognized in 2005 (Fig. 1) during an extensive epidemic of severe G9-related gastroenteritis involving children living in Rio Branco, Acre State, Brazil's Western Amazon [41].

In general rotaviruses other than G1, G2 and G9 were detected at low prevalence rates during the 27-year review period, including G3, G4 and strains bearing mixed (dual) serotype-specificities. Furthermore, we found significant numbers (22.7%; 293 out of 1286 specimens) of non-typeable rotavirus strains, which may in part have been due to a lack of sensitivity of methods used in the initial studies. However, it is likely that a proportion of samples were rotaviruses of G types other than G1–G4 and G9.

Among the 247 rotavirus strains that could be analyzed for G- and P-genotype specificities, 190 (77%) samples comprised the globally common G1P[8], G2P[4] and G9P[8] combinations, although less common types such as G1P[4], G1P[6], G2P[8], G2P[6], G4P[6], and G9P[4] were also identified at lower frequencies. Interestingly, some of these unusual viruses possess P[6] VP4 type-specificity and are found commonly infecting neonates [40]. Following a pattern similar to that generally reported worldwide, G1, G4 and G9 types had “long” electropherotypes, whereas G2 viruses displayed a “short” RNA pattern. It is notable that G2P[4] strains isolates from children and adults from January to September 2006 in Parauapebas, Southern Pará state, Brazil (Study K), showed identical electrophoretic profiles, suggesting a possible common source of infection.

A major limitation of our analysis was the fact that the numerous reported studies conducted during 1981–2008 are often difficult to compare due to differences in methodologies such as age groups, time of surveillance, and severity of disease definitions. Nonetheless, the large amount of data gathered throughout 27 years in northern Brazil provides useful information on the dynamics of rotavirus strains circulation profiles in a pre-vaccination period and early after introduction of rotavirus vaccine in Brazil.

The availability of data on the rotavirus strain characterization during 27 years in the northern region highlights a variable (and fluctuating) type composition of co-circulating serotypes. These conditions can trigger quick changes over time, resulting in rotavirus

evolution via natural gene reassortment events and other mechanisms, and therefore posing a challenge to currently adopted vaccines. It is therefore strongly recommended to pursue continuous longitudinal surveillance and epidemiological studies in the region and elsewhere in Brazil, in order to determine the true incidence of rotavirus serotypes during the post-vaccine era. This would allow assessing the possible effect of vaccination on rotavirus strain circulation, including the potential for serotype replacement.

#### Conflict of interest

All investigators were funded through their institutions by GlaxoSmithKline Biologicals.

Nervo Sánchez and Romulo E. Colindres were employed by GlaxoSmithKline Biologicals at the time of this study.

Alessilva Oliveira, Joana D'Arc P. Mascarenhas, Luana S. Soares, Sylvia F.S. Guerra, Yvone B. Gabbay, Maria Cleonice A. Justino and Alexandre C. Linhares declare no conflict of interests.

#### Role of funding source

This study was sponsored by GlaxoSmithKline Biologicals. Study sponsors were involved in the study design, in the analysis and interpretation of data, in the writing of the manuscript, and in the decision to submit the manuscript for publication.

Alessilva Oliveira: Contribution to the laboratory methods, analysis of the data and reviewing of the manuscript.

Joana D'Arc P. Mascarenhas: Contribution to the laboratory methods, analysis of the data and reviewing of the manuscript.

Luana S. Soares: Contribution to the laboratory methods.

Sylvia F.S. Guerra: Contribution to the laboratory methods.

Yvone B. Gabbay: Contribution to the laboratory methods, analysis of the data and reviewing of the manuscript.

Nervo Sánchez: Analysis of data and reviewing of the manuscript.

Romulo E. Colindres: Analysis of data and reviewing of the manuscript.

Maria Cleonice A. Justino: Contribution to clinical evaluation of children, analysis of the data and reviewing of the manuscript.

Alexandre C. Linhares: Contribution to the laboratory methods, analysis of the data and writing of the first draft.

All authors were involved in the critical revision of drafts and have approved the final manuscript version for submission.

#### Trademarks

*Rotarix*<sup>TM</sup> is a trademark of the GlaxoSmithKline group of companies.

*Rotateq*<sup>TM</sup> is a trademark of Merck & Co, Inc.

#### Acknowledgements

The authors would like to acknowledge the technical assistance given by the laboratory personnel at the Virology Section of the *Instituto Evandro Chagas*, Health Surveillance Secretariat, Brazilian Ministry of Health.

#### References

- [1] U.D. Parashar, C.J. Gibson, J.S. Bresee, R.I. Glass, Rotavirus and severe childhood diarrhea, *Emerg. Infect. Dis.* 12 (2006) 304–306.
- [2] G.M. Ruiz-Palacios, I. Pérez-Schael, F.R. Velázquez, et al., Safety and efficacy of an attenuated vaccine against severe rotavirus gastroenteritis, *N. Engl. J. Med.* 354 (2006) 11–22.
- [3] T. Vesikari, D. Matson, P. Dennehy, et al., Safety and efficacy of pentavalent human-bovine (WC3) reassortant rotavirus vaccine, *N. Engl. J. Med.* 354 (2006) 22–33.
- [4] World Health Organization, Rotavirus vaccines, *Wkly Epidemiol. Rec.* 82 (2007) 285–295.
- [5] Brazilian Ministry of Health, Sistema de Informações do Programa Nacional de Imunizações, Brasília. <[http://pni.datasus.gov.br/inf\\_estadistica\\_cobertura.asp](http://pni.datasus.gov.br/inf_estadistica_cobertura.asp)>, 2011 (accessed 08.12.11).
- [6] S.A. Madhi, N.A. Cunliffe, D. Steele, et al., Effect of human rotavirus vaccine in severe diarrhea in African infants, *N. Engl. J. Med.* 362 (2010) 289–298.
- [7] G.E. Armah, S.O. Sow, R.F. Breiman, et al., Efficacy of pentavalent rotavirus vaccine against severe rotavirus gastroenteritis in infants in developing countries in sub-Saharan Africa, a randomised, double-blind, placebo-controlled trial, *Lancet* 376 (2010) 606–614.
- [8] K. Zaman, D.A. Anh, J.C. Victor, et al., Efficacy of pentavalent rotavirus vaccine against severe rotavirus gastroenteritis in infants in developing countries in Asia, a randomised, double-blind, placebo-controlled trial, *Lancet* 376 (2010) 615–623.
- [9] World Health Organization, Rotavirus vaccines, an update, *MMWR, Wkly Epidemiol. Rec.* 84 (2009) 533–538.
- [10] A.C. Linhares, F.R. Velázquez, I. Pérez-Schael, et al., Efficacy and safety of an oral live attenuated human rotavirus vaccine against rotavirus gastroenteritis during the first 2 years of life in Latin American infants, a randomized, double-blind, placebo-controlled phase III study, *Lancet* 371 (2008) 1181–1189.
- [11] T. Vesikari, A. Karvonen, R. Primula, et al., Efficacy of human rotavirus vaccine against rotavirus gastroenteritis during the first 2 years of life in European infants, randomised, double-blind controlled study, *Lancet* 370 (2007) 1757–1763.
- [12] J. Matthijnsens, M. Ciarlet, M. Rahman, et al., Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all genomic RNA segments, *Arch. Virol.* 153 (2008) 1621–1629.
- [13] O. Solberg, M. Hasing, G. Trueba, et al., Characterization of novel VP7, VP4, and VP6 genotypes of a previously untypeable group A rotavirus, *Virology* 385 (2009) 58–67.
- [14] N. Santos, Y. Hoshino, Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine, *Rev. Med. Virol.* 15 (2005) 29–56.
- [15] J.P. Leite, F.A. Carvalho-Costa, A.C. Linhares, Group A rotavirus genotypes and the ongoing Brazilian experience – a review, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 103 (2008) 745–753.
- [16] A.S.L. De Oliveira, J.D.P. Mascarenhas, L.S. Soares, et al., Re-emergence of G2 rotavirus serotypes in northern Brazil reflects a natural changing pattern over time, in: *Eighth International Rotavirus Symposium*, Istanbul, Turkey, June 3–4, 2008 (abstracts), pp. 60–61.
- [17] R.Q. Gurgel, L.E. Cuevas, S.C.F. Vieira, et al., Predominance of rotavirus P[4] G2 in a vaccinated population, Brazil, *Emerg. Infect. Dis.* 13 (2007) 1571–1573.
- [18] R.Q. Gurgel, N.A. Cunliffe, O. Nakagomi, L.E. Cuevas, Rotavirus genotypes circulating in Brazil before national rotavirus vaccination – a review, *J. Clin. Virol.* 43 (2008) 1–8.
- [19] F.A. Carvalho-Costa, I.T. Araújo, R.M. De Assis, et al., Rotavirus genotype distribution after vaccine introduction, Rio de Janeiro, Brazil, *Emerg. Infect. Dis.* 15 (2009) 95–97.
- [20] T. Nakagomi, L.E. Cuevas, R.G. Gurgel, et al., Apparent extinction of non-G2 rotavirus strains from circulation in Recife, Brazil after the introduction of rotavirus vaccine, *Arch. Virol.* 153 (2008) 591–593.
- [21] H.G. Pereira, A.C. Linhares, J.A.N. Candeias, R.I. Glass, National laboratory surveillance of viral agents of gastroenteritis in Brazil, *Bull. Pan Am. Health Org.* 27 (1993) 224–233.
- [22] A.C. Linhares, Y.B. Gabbay, R.B. Freitas, E.S. Travassos da Rosa, J.D.P. Mascarenhas, E.C.B. Loureiro, Longitudinal study of rotavirus infections among children from Belém, Brazil, *Epidemiol. Infect.* 102 (1989) 129–145.
- [23] A.C. Linhares, J.M.M. Moura, Y.B. Gabbay, P.S.C. Rabello-Mendes, J.D. Mascarenhas, R.C. Azevedo, Rotavirus serotypes and electropherotypes among children attending three pediatric hospitals in Belém, Brazil, *J. Trop. Pediatr.* 39 (1993) 137–141.
- [24] A.C. Linhares, Y.B. Gabbay, J.D.P. Mascarenhas, et al., Immunogenicity, safety and efficacy of rhesus-human, reassortant rotavirus vaccine in Belém, Brazil, *Bull. WHO* 74 (1996) 491–500.
- [25] R.H.P. Gusmão, J.D.P. Mascarenhas, Y.B. Gabbay, et al., Rotavirus subgroups, G serotypes, and electropherotypes in cases of nosocomial infantile diarrhoea in Belém, Brazil, *J. Trop. Pediatr.* 45 (1999) 81–86.
- [26] C.R.N.E. Luz, J.D.P. Mascarenhas, Y.B. Gabbay, et al., Rotavirus serotypes and electropherotypes identified among hospitalized children in São Luís, Maranhão, Brazil, *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 47 (2005) 287–293.
- [27] B. Salinas, I. Pérez-Schael, A.C. Linhares, et al., Evaluation of safety, immunogenicity and efficacy of an attenuated rotavirus vaccine, RIX4414, *Pediatr. Infect. Dis. J.* 24 (2005) 807–816.
- [28] H. Abate, A.C. Linhares, G. Venegas, et al., Results of a hospital-based study on rotavirus gastroenteritis in Latin American children, in: *24th International Congress of Pediatrics (ICP)*, Cancun, Mexico, August 15–20, 2004 (abstract), p. 656.
- [29] A.C. Linhares, Rotavirus infection in Brazil, epidemiology and challenges for its control, *Cad Saúde Publica* 16 (2000) 629–646.
- [30] N.A. Page, A.D. Steele, Antigenic and genetic characterization of serotype G2 human rotavirus strains in South Africa from 1984 to 1998, *J. Med. Virol.* 72 (2004) 320–327.
- [31] A. Ferrera, D. Quan, F. Espinoza, Increased prevalence of genotype G2P [4] among children with rotavirus-associated gastroenteritis in Honduras, in:

- 17th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ICC), Munich, Germany, March 31–April 04, 2007.
- [32] A. Amarilla, E.E. Espínola, M.E. Galeano, et al., Rotavirus infection in the Paraguayan population from 2004 to 2005, high incidence of rotavirus strains with short electropherotype in children and adults, *Med. Sci. Monit.* 13 (2007) CR333–CR337.
- [33] L.E. Esteban, R.P. Rota, J.R. Gentsch, et al., Molecular epidemiology of group A rotavirus in Buenos Aires, Argentina 2004–2007: reemergence of G2P[4] and emergence of G9P[8] strains, *J. Med. Virol.* 82 (2010) 1083–1093.
- [34] A.C. Linhares, J.A. Stupka, A. Ciapponi, et al., Burden and typing of rotavirus group A in Latin America and the Caribbean: systematic review and meta-analysis, *Rev. Med. Virol.* (2011) [Epub ahead of print], doi:10.1002/rmv.682.
- [35] M.M. Patel, L.H. De Oliveira, A.M. Bispo, J. Gentsch, U.D. Parashar, Rotavirus P [4] G2 in a vaccinated population, Brazil, *Emerg. Infect. Dis.* 14 (2008) 863–865.
- [36] A.C. Linhares, F.R. Velázquez, Rotavirus P [4] G2 in a vaccinated population, Brazil, *Emerg. Infect. Dis.* 14 (2008) 863–865.
- [37] G.E. Armah, A.D. Steele, F.N. Binka, et al., Changing patterns of rotavirus genotypes in Ghana, emergence of human rotavirus G9 as major cause of diarrhea in children, *J. Clin. Microbiol.* 41 (2003) 2317–2322.
- [38] World Health Organization, Global networks for surveillance of rotavirus gastroenteritis, *Wkly Epidemiol. Rec.* 47 (2008) 421–428.
- [39] C. Kirkwood, N. Bogdanovic-Sakran, G. Barnes, R. Bishop, Rotavirus serotype G9P[8] and acute gastroenteritis outbreak in children, northern Australia, *Emerg. Infect. Dis.* 10 (2004) 1593–1600.
- [40] A.C. Linhares, T. Verstraeten, J. Wolleswinkel-Van den Bosch, R. Clemens, T. Breuer, Rotavirus serotype G9 is associated with more-severe disease in Latin America, *Clin. Infect. Dis.* 43 (2006) 312–314.
- [41] A.A. Siqueira, A.C.F.S. Santelli, L.R. Alencar, et al., Outbreak of acute gastroenteritis in young children with death due to rotavirus genotype G9 in Rio Branco, Brazilian Amazon region, 2005, *Int. J. Infect. Dis.* 14 (2010) e898–e903.

## 6.2 ARTIGO 2 : Molecular Analysis of structural genes of the G2 rotavirus circulating for 20 years in the Amazon region of Brazil.

\*Manuscript

[Click here to download Manuscript: artigo dout verso final.docx](#)

[Click here to view linked References](#)

### 1 **Molecular Analysis of structural genes of the G2 rotavirus circulating for 20 years in the** 2 **Amazon region of Brazil.**

3  
4 **Alessilva do Socorro Lima de Oliveira <sup>a\*</sup>, Sylvia de Fátima dos Santos Guerra, Josué de**  
5 **Sousa Pinto Filho; Luana da Silva Soares <sup>a</sup>, Darleise Silva de Oliveira <sup>a</sup>; Alexandre da**  
6 **Costa Linhares <sup>a</sup>, Joana D’Arc Pereira Mascarenhas <sup>a</sup>.**

7 <sup>a</sup>*Seção de Virologia, <sup>b</sup>Seção de Epidemiologia, Instituto Evandro Chagas, Secretaria de Vigilância em Saúde,*  
8 *Ministério da Saúde, Rodovia BR 316 – KM 07, S/N, Levilândia, 67.030-000, Ananindeua, Pará, Brasil.*

9 \* Corresponding author: Tel: + 55 91 21213701

10 *E-mail addresses: [alessilvaoliveira@iec.pa.gov.br](mailto:alessilvaoliveira@iec.pa.gov.br)*

#### 11 12 **Abstract:**

13 The group A rotaviruses (RVA) are the main cause of diarrhoea, accounting for  
14 approximately 40% of the morbidity and mortality related to diarrhoeal disease in children  
15 around the world before the introduction of a vaccine. Studies performed in Brazil in 2006  
16 after the introduction of an RVA vaccine have shown that the G2 genotype of RVA has  
17 resurfaced, being detected in up to 82% of children less than five years of age. This  
18 observation raises questions about the protection conferred by the vaccine against the G2  
19 genotype, as well as the occurrence of a vaccine-driven selective pressure. Little is known  
20 about the evolution and diversity of the G2 genotype and the possible influence of the vaccine  
21 on its propagation and diversity. To provide a better understanding of the genetic diversity of  
22 the RVA G2 genotype, we performed an analysis of the structural genes from samples that  
23 have circulated for 20 years in the Amazon region of Brazil. All analyzed strains showed a I2-  
24 R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2 genomic background. Phylogenetic analyses showed that there  
25 is a continuous evolution of the VP7 gene of the G2 genotype, responsible for a recurring  
26 succession of the circulating lines, and two lineages and three sub-lineages have been detected  
27 for longer than a 20-year period. Three important substitutions in the antigenic regions of VP7  
28 (A87T, D96N and S213D) were identified in samples that have been circulating since the  
29 1990s. These changes may have increased the propagation capacity of the circulating strains  
30 in environments where there is vaccine coverage for RVA. In some samples, a strong  
31 correlation with genes of animal origin was found for the VP2, VP3 and NSP4 genes. This  
32 study provides evidence for genetic diversity in the RVA G2 genotype, contributing to the  
33 elucidation of the epidemiological dynamics of this genotype over time.

#### 34 35 **1. Introduction**

36 Diarrhoeal disease is the fourth leading cause of morbidity and mortality worldwide among  
37 children five years of age and younger; in 2013, it accounted for 578,000 deaths in this age  
38 group (Liu et al., 2015). In Brazil, 3,906,335 cases of acute diarrhoeal disease were detected  
39 in 2010, resulting in 3,948 deaths, 356 of which were recorded in the north region and 160 in  
40 the state of Pará (Esparza-Aguilar, 2009). Group A rotaviruses (RVA) are the leading cause of  
41 diarrhoea and accounted for approximately 40% of the morbidity and mortality related to  
42 diarrhoeal disease in children around the world before the introduction of a vaccine (Tate et  
43 al., 2012).

44 RVA belongs to the *Reoviridae* family and the genus *Rotavirus*. Its genome of approximately  
45 18,500 base pairs (bp) is composed of 11 segments of double-stranded RNA (dsRNA) and is  
46 surrounded by three concentric layers of proteins. Each segment encodes a single protein  
47 except for the last one, which encodes two, yielding a total of 12 proteins, of which six are



48 structural proteins (VP1-4, VP6-7) and six are non-structural proteins (NSP1-5 / 6). Currently  
 49 recognized are 32 G (VP7), 46 P (VP4), 24 I (VP6), 18 R (VP1), 17 C (VP2), 17 M (VP3), 28  
 50 A (NSP1), 17 N (NSP2), 19 T (NSP3), 24 E (NSP4) and 19 H (NSP5) (Matthijssens et al.,  
 51 2011, Trojnar et al., 2013; Rotavirus Classification Working Group (RCWG, 2015); Li et al.,  
 52 2016).

53 In 2006, Brazil adopted in its National Immunization Program (Programa Nacional de  
 54 Imunizações - PNI) the Rotarix® vaccine (GlaxoSmithKline Biologicals) of human origin  
 55 (the G1P genotype) [8]. Rotarix® was tested in phase II and III trials in Belém and produced  
 56 satisfactory results against severe gastroenteritis and hospitalization for RVA (Linhares and  
 57 Breese, 2000; Linhares et al., 2006; Carvalho Costa et al., 2009; Lanzieri et al., 2010).

58 The RVA G2 genotype produces a short electrophoretic profile and belongs to the DS-1  
 59 genogroup. However, studies have also detected a long migration profile, which may suggest  
 60 a genetic rearrangement under natural conditions between RVA belonging to the two largest  
 61 genogroups, Wa and DS-1 (Kapikian et al., 2001).

62 Studies conducted in 2006 after the introduction of the vaccine showed a resurgence of the G2  
 63 genotype in Brazil and its occurrence in 82% of children less than five years of age. This  
 64 raised concerns about the protection given by the vaccine to the G2 genotype and the possible  
 65 occurrence of a selective pressure imposed by the vaccine (Gurgel et al., 2008; Domingues et  
 66 al., 2008; Leite et al., 2008; Nakagomi et al., 2008; Munford et al., 2009; Morillo et al., 2010;  
 67 Borges et al., 2011; Justino et al., 2011, Oliveira et al., 2012, Guerra et al., 2015). However,  
 68 the fact that this genotype also has a high occurrence in countries where there has been no  
 69 implementation of a vaccine against RVA, as well as where vaccine coverage was minimal,  
 70 may suggest a natural fluctuation of this genotype (Justino et al., 2011). Studies in northern  
 71 Brazil have identified the G2 genotype as the most frequent in the region since 2006 (de  
 72 Oliveira et al., 2010; Mascarenhas et al., 2010; Justino et al., 2011). An analysis of G2  
 73 genotype samples showed the occurrence of genetic rearrangements in the studied genes and  
 74 suggests that these rearrangements may have been caused by the introduction of the vaccine  
 75 in children (Gomez et al., 2011). The present study investigates the possible changes in the  
 76 genes that may be associated with the prevalence and maintenance of this genotype after  
 77 implantation of the vaccine, thus providing a better understanding of the genetic diversity of  
 78 the RVA G2 genotype and its behaviour over the last 20 years in the Amazon region. In  
 79 addition, this work will guide further studies, especially those related to vaccination strategies  
 80 against RVA.

## 81 **2. Materials and Methods**

### 82 **2.1. Faecal samples, viral RNA extraction and PCR amplification**

83 A total of 40 stool specimens were collected between 1992 and 2012 from children  
 84 with diarrhoea, previously genotyped as G2 strain. These specimens were obtained from five  
 85 states in the Northern Region of Brazil ( Acre [3 samples], Amapá [1 sample], Amazonas [10  
 86 samples], Pará [23 samples] and Roraima [ 3 samples ]. Viral genome was extracted from  
 87 10% fecal suspensions using guanidinium isothiocyanate-silica (Boom et al., 1990). All  
 88 samples were subjected to reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), using  
 89 consensus primers, as described previously (Varghese et al., 2006, Gentsch et al., 1992; Both  
 90 et al., 1984 Gouvea et al., 1994).

91 **2.2. Nucleotide Sequencing and phylogenetic analysis:** Genes of G2 RVA strains  
 92 were partially sequenced using the same primers as those used in PCR carried out with a Big  
 93 Dye Terminator cycle sequencing reaction kit v.3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA).  
 94 The products were analysed using an automatic ABI Prism 3130xl DNA sequencer (Applied  
 95 Biosystems). The nucleotide sequences were aligned and edited using the BioEdit Sequence  
 96 Alignment Editor program (Version 7.0.5.2) and compared with the corresponding gene  
 97 fragments of RVA strains available in GenBank. Phylogenetic analysis was performed with

98 MEGA software version 4.1.0 using the Neighbour-joining (NJ) method. For NJ, a distance  
99 matrix calculated from the aligned sequences using the Kimura two-parameter formula was  
100 used (Kimura, 1980). To determine the reliability of the tree topology, a bootstrap test of  
101 2,000 replicates was performed. All rotavirus sequences obtained here from humans and  
102 animals have been deposited in GenBank and assigned accession numbers KX397638-  
103 KX397678,

104

105

### 3. Results

106

#### 3.1. Phylogenetic analysis and amino acid composition of VP7 and VP8\* proteins

107

108

Phylogenetic analysis revealed the existence of two lineages (II and III) and three sub-  
lineages (IIa, IIc and IId) over a 20-year period.

109

110

111

112

113

114

115

116

117

118

119

120

Lineage III, which was detected in samples collected from 1997 to 1999 in Belém do Pará, is  
very similar to samples from Italy and Brazil that circulated in 1996 and 2002, respectively,  
and were also very similar (99.94% to 100%) to each other (data not shown). Lineage II  
samples clustered with sub-lineages IIa, IIc and IId. Sub-lineage IIa circulated from 2006 to  
2011 in the states of Pará, Amazonas and Roraima. These samples clustered with samples  
from various parts of the world such as South Africa (1996), Taiwan (1994) and Brazil  
(2006). The IIc sub-lineages were detected in samples that circulated from 2006 to 2012 in all  
regions included in the study, and an RVA sample circulating in 1993 in Belém do Pará is  
also part of this sub-lineage. The vast majority of the samples included in this lineage  
circulated after the implementation of the RVA vaccine in Brazil. The IId sub-lineage  
includes samples from 1993, 1994 and 1997 that circulated in Belém, Pará and are very  
similar to samples from Kenya (1999), China (1996) and Brazil (1997).

121

122

123

124

125

126

127

128

129

130

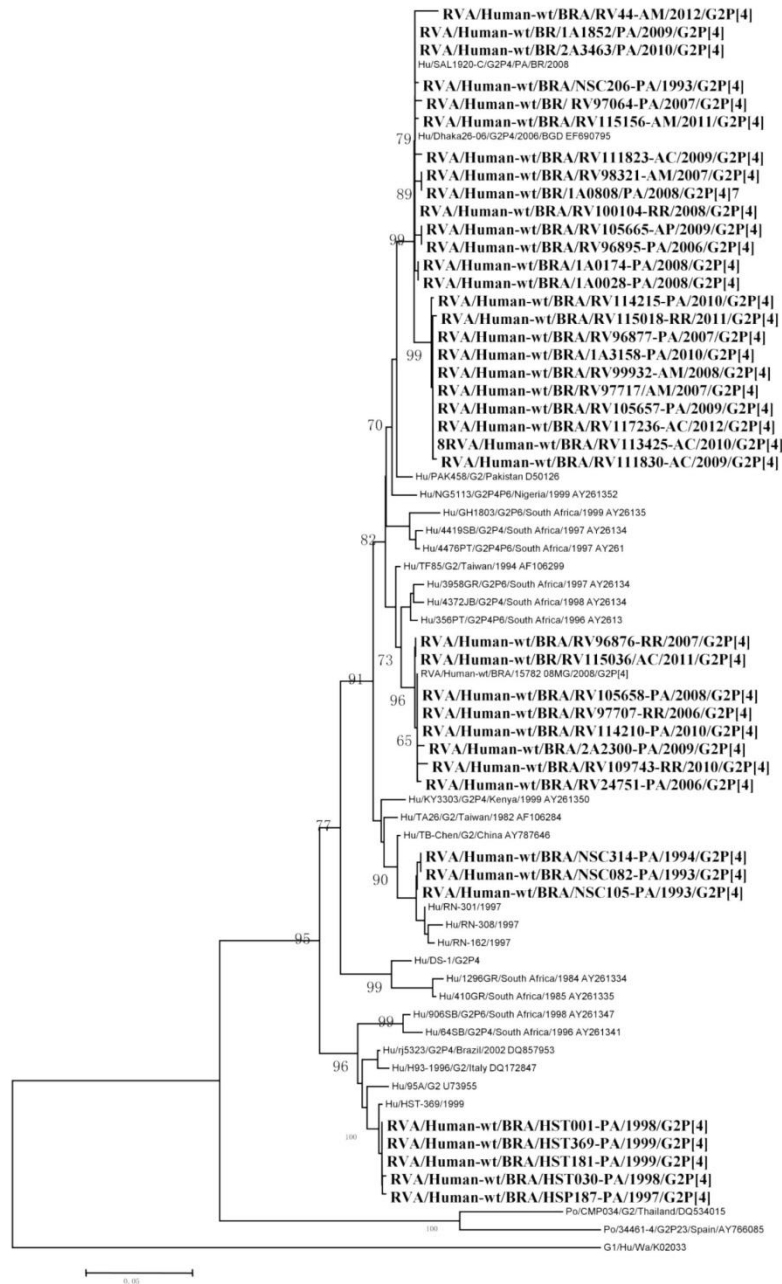
131

132

133

134

Amino acid (aa) analysis of the VP7 protein showed changes in key regions. A substitution  
was observed at aa 213, which belongs to the antigen C region (N→S in lineage III and N→D  
in lineage II). The basic structural features may have been modified in some samples due to a  
change in a proline site (aa 75). The cysteine sites and the other prolines remained preserved  
in all samples. Lineage II encompasses most of the samples of this study, and in the IIc sub-  
lineage, the most important amino acid changes were aa 44 (I → M) in the signal peptide; aa  
87 (A → T) and aa 96 (D → N), both in antigenic region A; and aa 213 (N → D) in antigenic  
region C. An amino acid substitution at position 96 (D → N) may induce changes in the  
electrical charge. In addition, this group includes the 96877 / PA / 2007 sample, which  
underwent a significant change in position aa 146 (N → S), the B antigenic region and the  
glycosylation site.



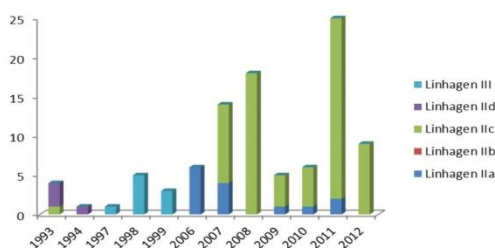
135  
136  
137  
138  
139  
140  
141  
142

**Figure 1:** Phylogenetic analysis based on the nucleotide sequence of the coding region of the VP7 protein from RVA G2 genotype samples collected over a 20-year period in the Amazon region and on sequence prototypes representative of samples of human and animal origin. Only 40 of the 101 samples are represented in the tree. Bootstrap values (2,000 replicates) are indicated at the nodes of the tree.

### 143 3.2. Spatial and temporal distribution of G2 strains

144 Samples of the RVA G2 genotype had certain peculiarities with regards to their distribution  
 145 over time, emerging in an explosive and dominant way at certain points and then disappearing  
 146 at others. According to local data, G2 genotypes had a high incidence of circulation between  
 147 1992 and 1994 (Study Nosocomial), between 1998 and 2000 (Sentinel Hospital) and between  
 148 2006 and 2012 [Rotavirus Network (Rede Rotavirus) and Rotavirus Control Case Project  
 149 (Projeto Rotavirus Caso Controle)]. Between 1993 and 1994, shifts in lineage II and two sub-  
 150 lineages (IIc and IId) were detected. IIc was detected in only one sample from 1993; IId was  
 151 the predominant sub-lineage in this period. From 1996-2000, the presence of two lineages  
 152 was observed: (IId) and III. From 2006-2010, lineage II and two sub-lineages, IIa and IIc,  
 153 were present, and since 2012, IIc has been dominant.

154 Geographical distribution was only analysed from 2006-2012, and during this period, the  
 155 circulating strains were the same in all regions included in this study, revealing the absence of  
 156 geographical barriers for the dissemination of the G2 genotype.  
 157



158  
159  
160  
161

Figure 2: Temporal distribution of strains of the G2 genotype of rotavirus.

### 162 3.3. Whole-genome characterization of G2P[4] Brazilian strains

163 All analyzed strains showed a I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2 genomic background (Table 1  
 164 ). Although all strains displayed the same genotype constellation, different genetic variants of  
 165 circulating G2P[4] strains during the study period in Brazil were observed (Figs. and ). The  
 166 majority of the G2P[4] Brazilian strains analyzed in the current study) showed close  
 167 phylogenetic relationship with G2P[4] human strains detected mainly in Australia (1999,  
 168 2000, 2007), USA (2005, 2007), Italy (2006), China (2013) and Brazil (1998, 2008, 2009)  
 169 (Figs. 3 and ).

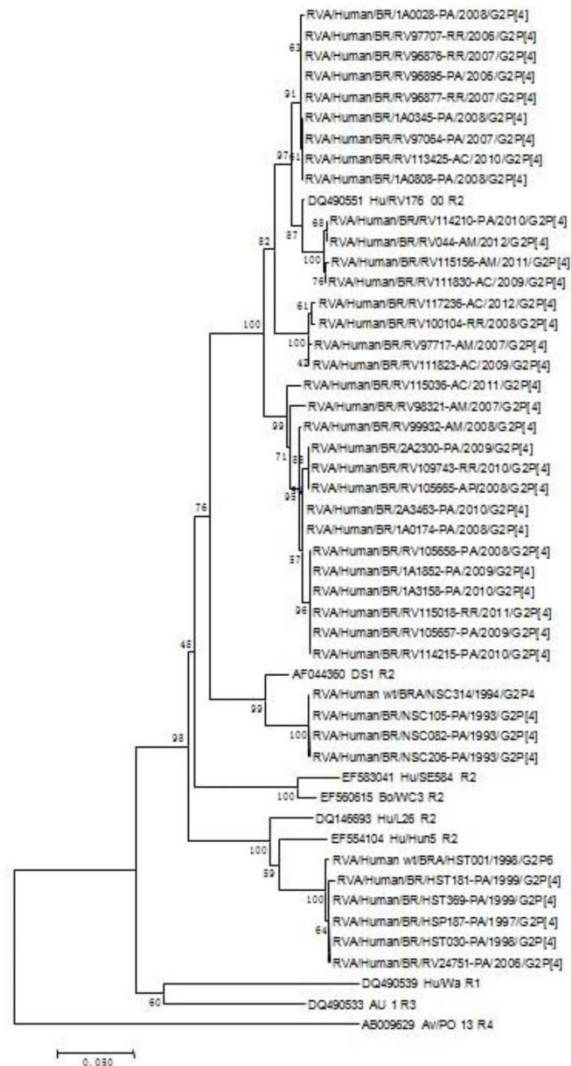
Name of the strains	Structural Protein						Non-structural Protein				
	VP1	VP2	VP3	VP4	VP6	VP7	NSP1	NSP2	NSP3	NSP4	NSP5
RVA/Human-wt/BR/RV115036/AC/2011/G2P[4]	R2	C2	M2	P4	I2	G2	A2	N2	T2	E2	H2
RVA/Human-wt/BR/1A1852/PA/2009/G2P[4]	R2	C2	M2	P4	I2	G2	A2	N2	T2	E2	H2
RVA/Human-wt/BR/2A3463/PA/2010/G2P[4]	R2	C2	M2	P4	I2	G2	A2	N2	T2	E2	H2
RVA/Human-wt/BR/RV97064-PA/2007/G2P[4]	R2	C2	M2	P4	I2	G2	A2	N2	T2	E2	H2
RVA/Human-wt/BRA/RV115156-AM/2011/G2P[4]	R2	C2	M2	P4	I2	G2	A2	N2	T2	E2	H2
RVA/Human-wt/BRA/RV44-AM/2012/G2P[4]	R2	C2	M2	P4	I2	G2	A2	N2	T2	E2	H2
RVA/Human-wt/BRA/RV98321-AM/2007/G2P[4]	R2	C2	M2	P4	I2	G2	A2	N2	T2	E2	H2
RVA/Human-wt/BR/RV97717/AM/2007/G2P[4]	R2	C2	M2	P4	I2	G2	A2	N2	T2	E2	H2
RVA/Human-wt/BRA/1A3158-PA/2010/G2P[4]	R2	C2	M2	P4	I2	G2	A2	N2	T2	E2	H2
RVA/Human-wt/BRA/RV99932-AM/2008/G2P[4]	R2	C2	M2	P4	I2	G2	A2	N2	T2	E2	H2
RVA/Human-wt/BR/1A0808/PA/2008/G2P[4]	R2	C2	M2	P4	I2	G2	A2	N2	T2	E2	H2
RVA/Human-wt/BRA/RV105657-PA/2009/G2P[4]	R2	C2	M2	P4	I2	G2	A2	N2	T2	E2	H2
RVA/Human-wt/BRA/RV105665-AP/2009/G2P[4]	R2	C2	M2	P4	I2	G2	A2	N2	T2	E2	H2
RVA/Human-wt/BRA/RV114210-PA/2010/G2P[4]	R2	C2	M2	P4	I2	G2	A2	N2	T2	E2	H2
RVA/Human-wt/BRA/RV105658-PA/2008/G2P[4]	R2	C2	M2	P4	I2	G2	A2	N2	T2	E2	H2
RVA/Human-wt/BRA/RV111823-AC/2009/G2P[4]	R2	C2	M2	P4	I2	G2	A2	N2	T2	E2	H2
RVA/Human-wt/BRA/2A2300-PA/2009/G2P[4]	R2	C2	M2	P4	I2	G2	A2	N2	T2	E2	H2

RVA/Human-wt/BRA/NSC206-PA/1993/G2P[4]	R2	C2	M2	P4	I2	G2	A2	N2	T2	E2	H2
RVA/Human-wt/BRA/RV100104-RR/2008/G2P[4]	R2	C2	M2	P4	I2	G2	A2	N2	T2	E2	H2
RVA/Human-wt/BRA/RV109743-RR/2010/G2P[4]	R2	C2	M2	P4	I2	G2	A2	N2	T2	E2	H2
RVA/Human-wt/BRA/RV96877-PA/2007/G2P[4]	R2	C2	M2	P4	I2	G2	A2	N2	T2	E2	H2
RVA/Human-wt/BRA/1A0174-PA/2008/G2P[4]	R2	C2	M2	P4	I2	G2	A2	N2	T2	E2	H2
RVA/Human-wt/BRA/1A0028-PA/2008/G2P[4]	R2	C2	M2	P4	I2	G2	A2	N2	T2	E2	H2
RVA/Human-wt/BRA/RV113425-AC/2010/G2P[4]	R2	C2	M2	P4	I2	G2	A2	N2	T2	E2	H2
RVA/Human-wt/BRA/RV115018-RR/2011/G2P[4]	R2	C2	M2	P4	I2	G2	A2	N2	T2	E2	H2
RVA/Human-wt/BRA/RV117236-AC/2012/G2P[4]	R2	C2	M2	P4	I2	G2	A2	N2	T2	E2	H2
RVA/Human-wt/BRA/RV114215-PA/2010/G2P[4]	R2	C2	M2	P4	I2	G2	A2	N2	T2	E2	H2
RVA/Human-wt/BRA/RV111830-AC/2009/G2P[4]	R2	C2	M2	P4	I2	G2	A2	N2	T2	E2	H2
RVA/Human-wt/BRA/RV96876-RR/2007/G2P[4]	R2	C2	M2	P4	I2	G2	A2	N2	T2	E2	H2
RVA/Human-wt/BRA/RV96895-PA/2006/G2P[4]	R2	C2	M2	P4	I2	G2	A2	N2	T2	E2	H2
RVA/Human-wt/BRA/RV97707-RR/2006/G2P[4]	R2	C2	M2	P4	I2	G2	A2	N2	T2	E2	H2
RVA/Human-wt/BRA/RV24751-PA/2006/G2P[4]	R2	C2	M2	P4	I2	G2	A2	N2	T2	E2	H2
RVA/Human-wt/BRA/NSC105-PA/1993/G2P[4]	R2	C2	M2	P4	I2	G2	A2	N2	T2	E2	H2
RVA/Human-wt/BRA/NSC082-PA/1993/G2P[4]	R2	C2	M2	P4	I2	G2	A2	N2	T2	E2	H2
RVA/Human-wt/BRA/NSC314-PA/1994/G2P[4]	R2	C2	M2	P4	I2	G2	A2	N2	T2	E2	H2
RVA/Human-wt/BRA/HST030-PA/1998/G2P[4]	R2	C2	M2	P4	I2	G2	A2	N2	T2	E2	H2
RVA/Human-wt/BRA/HST181-PA/1999/G2P[4]	R2	C2	M2	P4	I2	G2	A2	N2	T2	E2	H2
RVA/Human-wt/BRA/HST369-PA/1999/G2P[4]	R2	C2	M2	P4	I2	G2	A2	N2	T2	E2	H2
RVA/Human-wt/BRA/HST001-PA/1998/G2P[4]	R2	C2	M2	P4	I2	G2	A2	N2	T2	E2	H2
RVA/Human-wt/BRA/HSP187-PA/1997/G2P[4]	R2	C2	M2	P4	I2	G2	A2	N2	T2	E2	H2

170

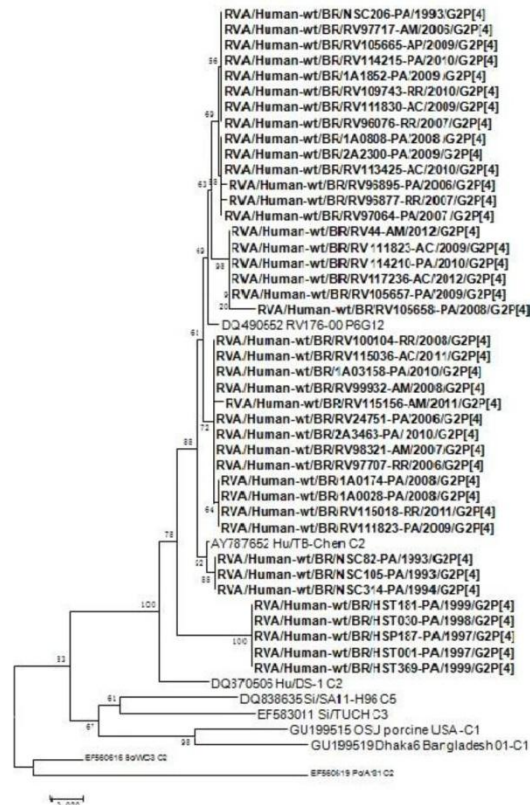
171

172 The samples tested for VP1 were classified in the R2 genotype (Figure 3), forming three  
173 distinct groups. The samples circulating from 2006-2010 were 99% similarity to strains RJ,  
174 MS, EC and MA that circulated from 2006 to 2008 and were also similar to other samples that  
175 have circulated in the US and Bangladesh. Several samples that circulated from 2008 to 2011  
176 were 98% similar to the VP1 gene of samples from RV G9 and G12. Sample  
177 115156/2011/AM was similar to samples from a study that showed inter-genogroup  
178 rearrangement for the G1 and G2 strains (Bányai et al., 2011).  
179



180  
181 **Figure 3:** Phylogenetic analysis based on the nucleotide sequence coding for the VP1 protein of RVA from  
182 studies conducted over 20 years in the Amazon region and on sequence prototypes representative of samples of  
183 human and animal origin. Bootstrap values (2,000 replicates) are indicated at the nodes of the tree.  
184

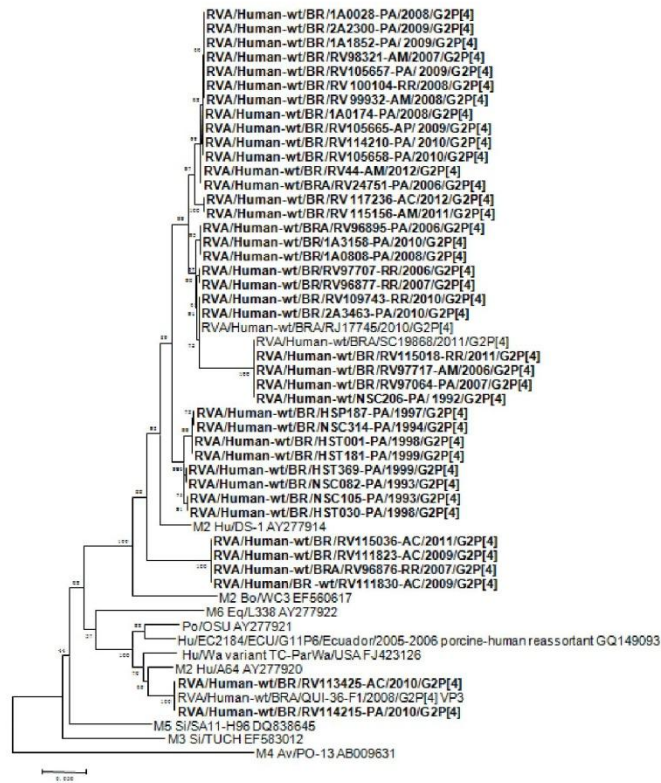
185 All samples tested for the VP2 gene clustered in genotype C2, forming three groups (Figure  
186 4). One of the groups encompasses samples from 1993-1999, and the other groups include  
187 strains from other study periods, which originated from various states in northern Brazil.  
188 These samples were 99% similar to other samples that circulated in Brazil and other countries,  
189 including the United States, Kenya and Bangladesh, during that same period. The sample  
190 RV44 / AM / 2012 was similar to samples found in Hungary during the same period and that  
191 were similar to the VP2 sequences from G8 samples (MWI/QOP387/2007/G8P[4]) and those  
192 of bovine origin.  
193



194  
195  
196  
197  
198  
199  
200  
201  
202  
203  
204  
205  
206  
207  
208  
209

**Figure 4:** Phylogenetic analysis based on the coding sequence nucleotides of the VP2 protein of RVA from studies conducted over 20 years in the Amazon region and on sequence prototypes representative of samples of human and animal origin. Bootstrap values (2,000 replicates) are indicated at the nodes of the tree.

The VP3 gene of samples in this study grouped with genotype M2; one sequence grouped with M1 (Figure 5). Samples from 2006 to 2012 were 99% similar to other samples that circulated in Brazil, Japan and the United States. Samples HSP 187/1997/PA and NSC 105/1993/PA were 99% similar to a recombinant VP3 of G2 and were also similar to the samples that circulated during the same period in northern Brazil in which recombination was evident between strains of human and animal origin. The sample HST181/1999 was 99% similar to the VP3 of the G9 sample that circulated in 1997 in Brazil. The samples 1A0174 and 1A0028/PA from 2008 showed 99% similarity to strain GO34 /G6P1 from goats detected in 2005.

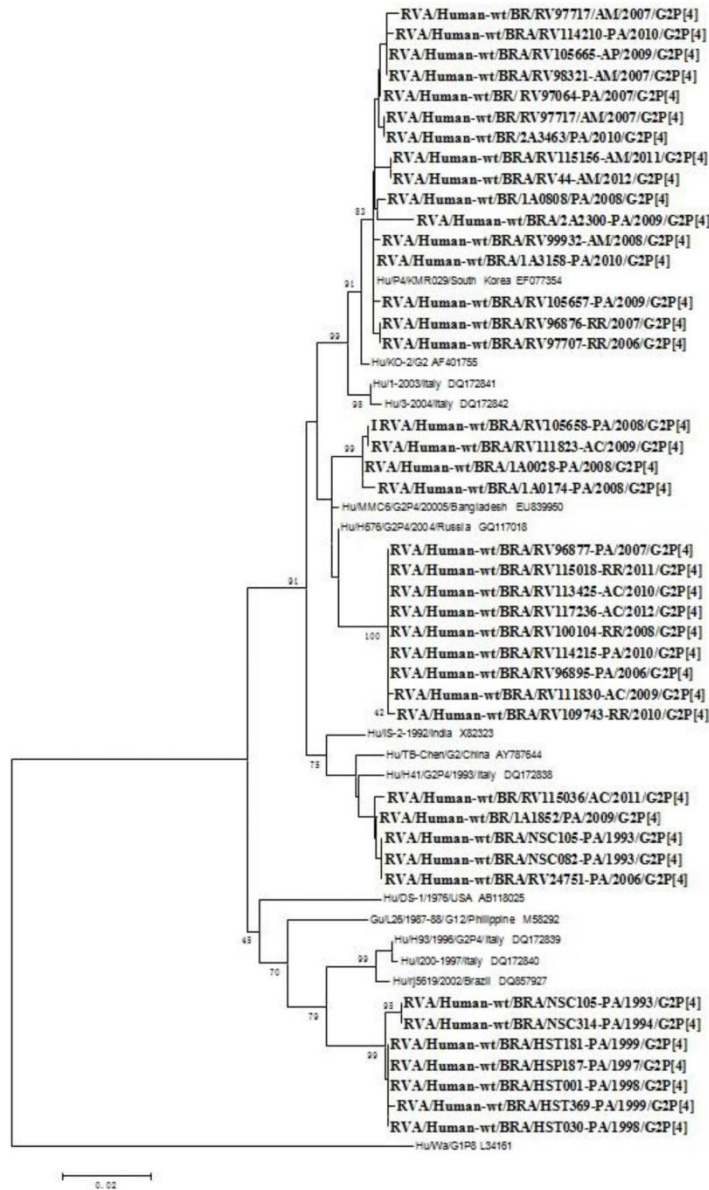


210  
 211 **Figure 5:** Phylogenetic analysis based on the nucleotide sequence coding for the VP3 protein of RVA from  
 212 studies conducted over 20 years in the Amazon region and on sequence prototypes representative of samples of  
 213 human and animal origin. Bootstrap values (2,000 replicates) are indicated at the nodes of the tree.

214  
 215 For the VP4 gene, the samples clustered into two lineages, P[4]-4 and P[4]-5 (Figure 6).  
 216 Lineage P[4]-4 comes exclusively from the sentinel hospital study conducted from 1998 to  
 217 2000 in Belém do Pará. Lineage P[4]-4 diverged 5.8% to 6.9% from P[4]-5. The lineage P [4]  
 218 -5 encompasses the other studied samples, which formed clusters that included samples from  
 219 different time periods (1993, 1994, 2006, 2007 and 2008) and various Brazilian states (PA,  
 220 AM and RR). Samples from 2006, 2007 and 2008 were distributed among three different  
 221 branches. These samples were similar to others from Russia, Bangladesh, Italy, Kenya and  
 222 Brazil. The samples 96877/2007 / PA, 1A0174 / PA / 2008 and 1A0028 / PA / 08 were 99%  
 223 similar to samples of human origin that showed similarity to samples of goat origin.

224



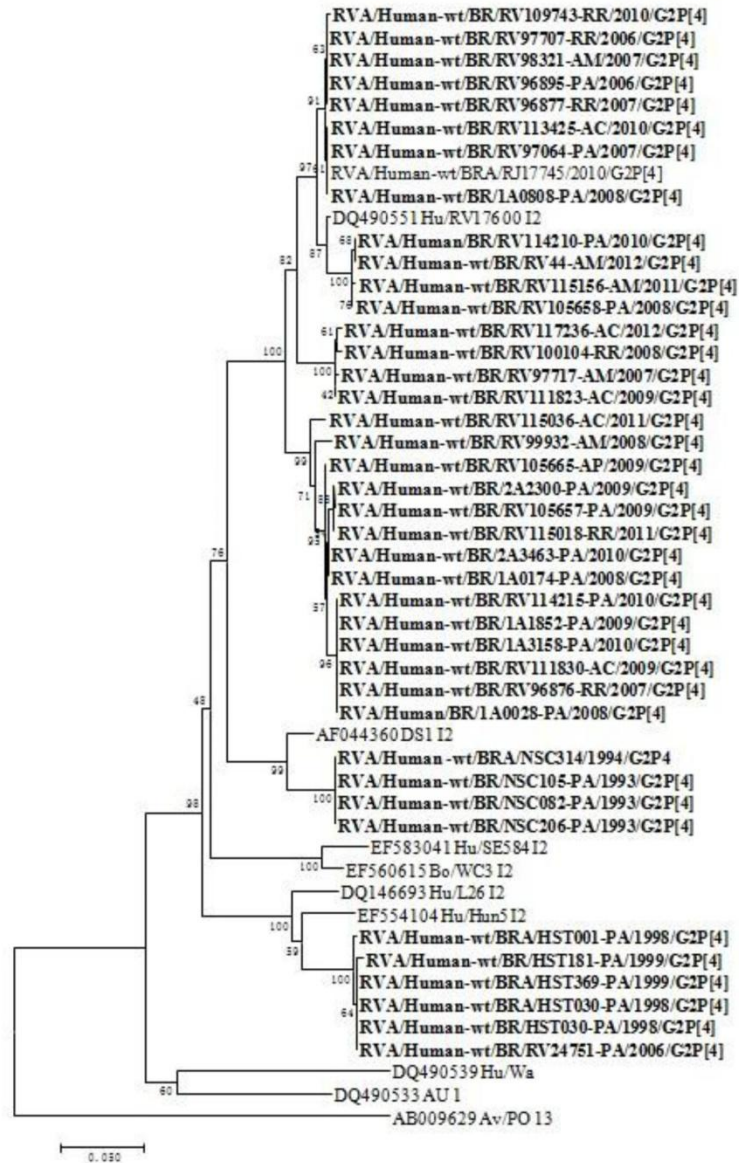


225  
 226  
 227  
 228  
 229  
 230  
 231  
 232  
 233  
 234  
 235  
 236

**Figure 6:** Phylogenetic analysis based on the nucleotide sequence of the VP4 protein coding region of RVA genotype G2 samples from studies conducted over 20 years in the Amazon region and on sequence prototypes representative of samples of human and animal origin. Only 40 samples are represented in the tree. Bootstrap values (2,000 replicates) are indicated at the nodes of the tree.

For the VP6 gene, samples clustered in the I2 genotype, forming three groups according to the year in which they were detected. These samples were similar to others that have circulated during the same period in Brazil, the United States and Australia, with similarities ranging from 97% to 100%. With respect to the amino acid sequence, frequent changes were found at positions 307 (A → N) and 344 (M → L).

237



238

239

240

241

242

243

244

245

246

247

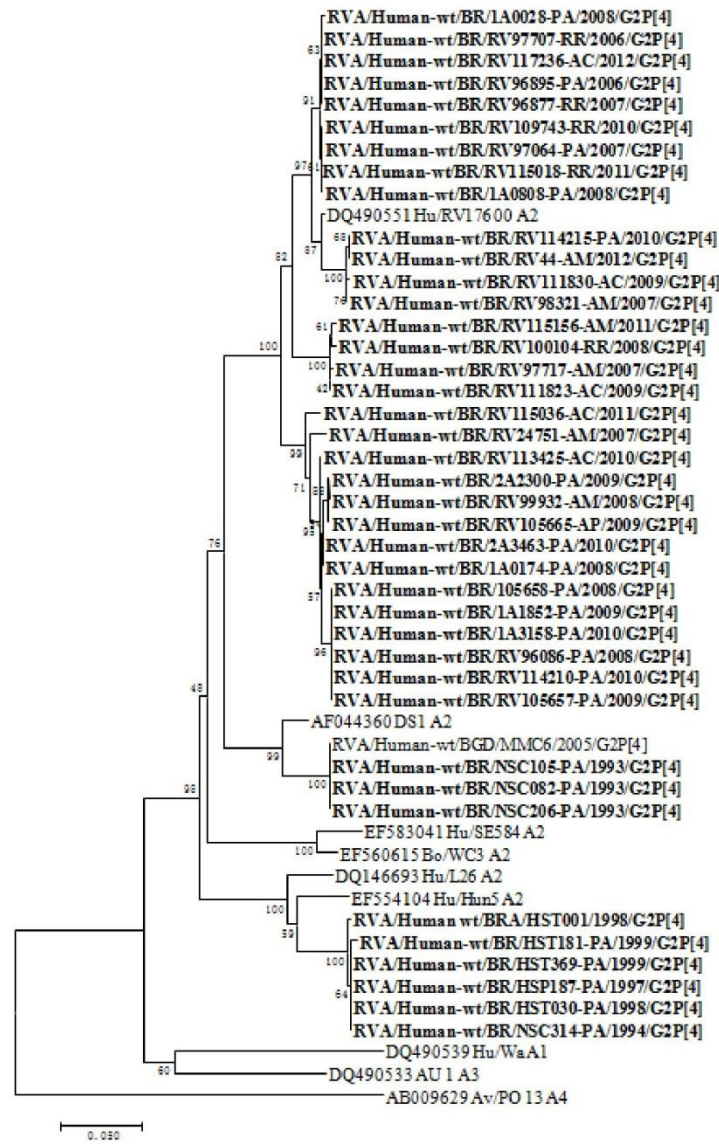
248

249

250

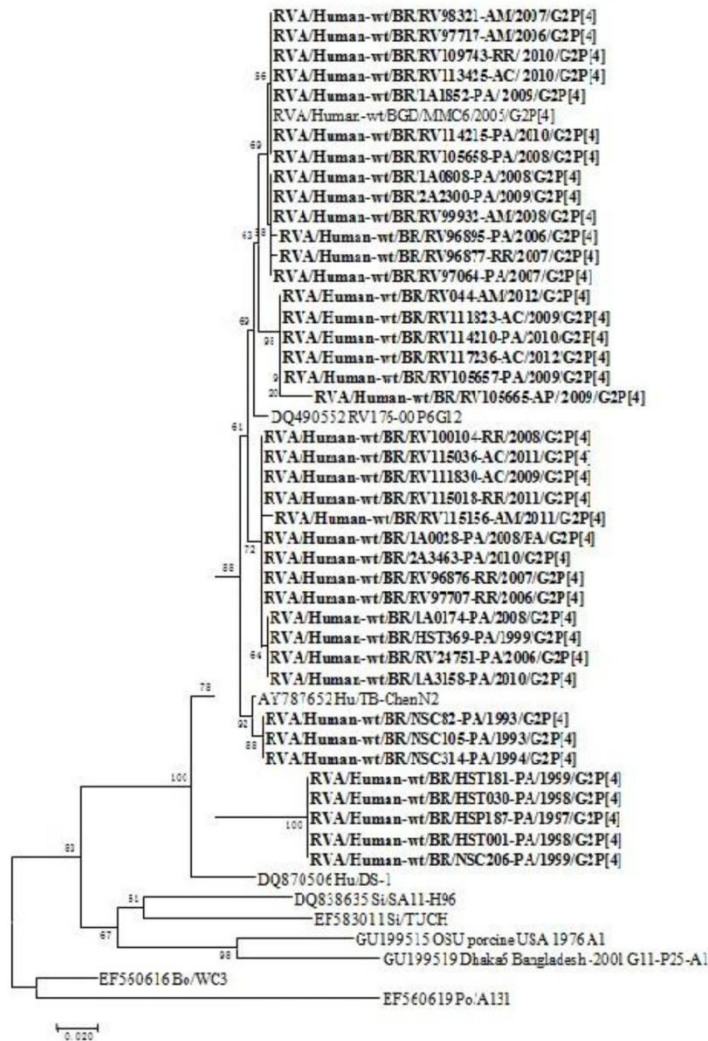
**Figure 7:** Phylogenetic analysis based on the nucleotide sequence of the coding region of the VP6 protein from RVA genotype G2 samples collected over 20 years in the Amazon region and on sequence prototypes representative of samples of human and animal origin. Bootstrap values (1000 replicates) are indicated at the nodes of the tree.

Phylogenetic analysis of samples for NSP1 protein identified the A2 strain presenting similarity of 99% with samples from Brazil, Bangladesh, USA, China, Australia that circulated in the same period as ours (Fig. 8).



251  
252  
253  
254  
255  
256  
257  
258  
259

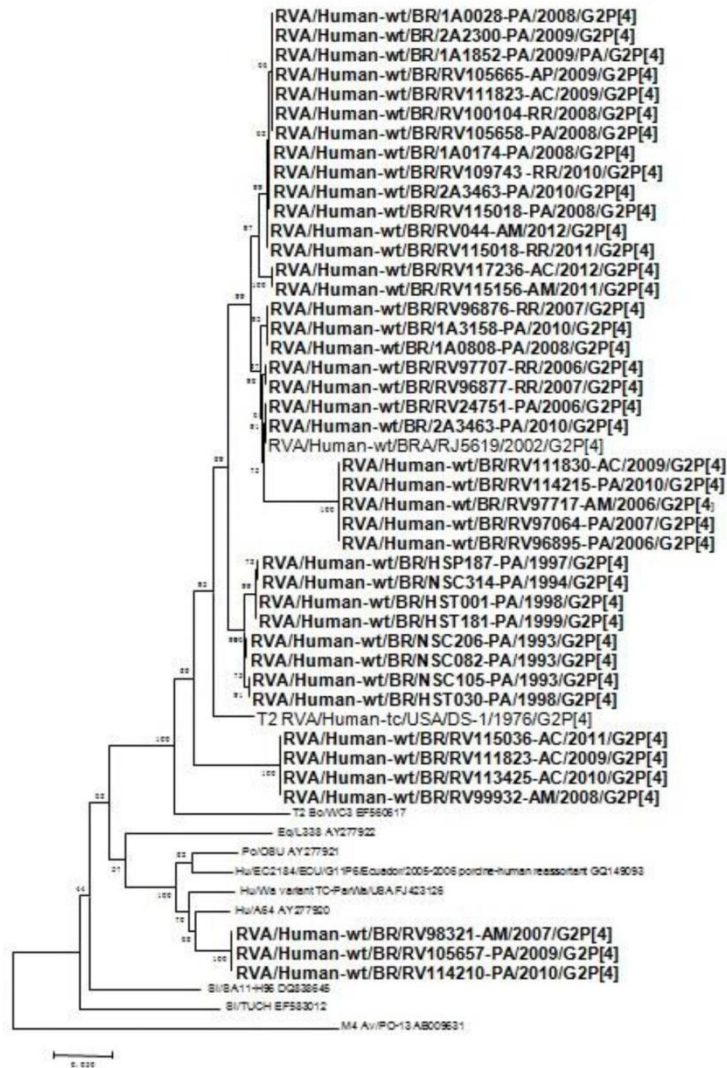
**Figure 8:** Phylogenetic analysis based on the nucleotide sequence of the coding region of the NSP1 protein from RVA genotype G2 samples collected over 20 years in the Amazon region and on sequence prototypes representative of samples of human and animal origin. Bootstrap values (1000 replicates) are indicated at the nodes of the tree.



260  
261  
262  
263  
264  
265  
266  
267  
268  
269  
270  
271  
272

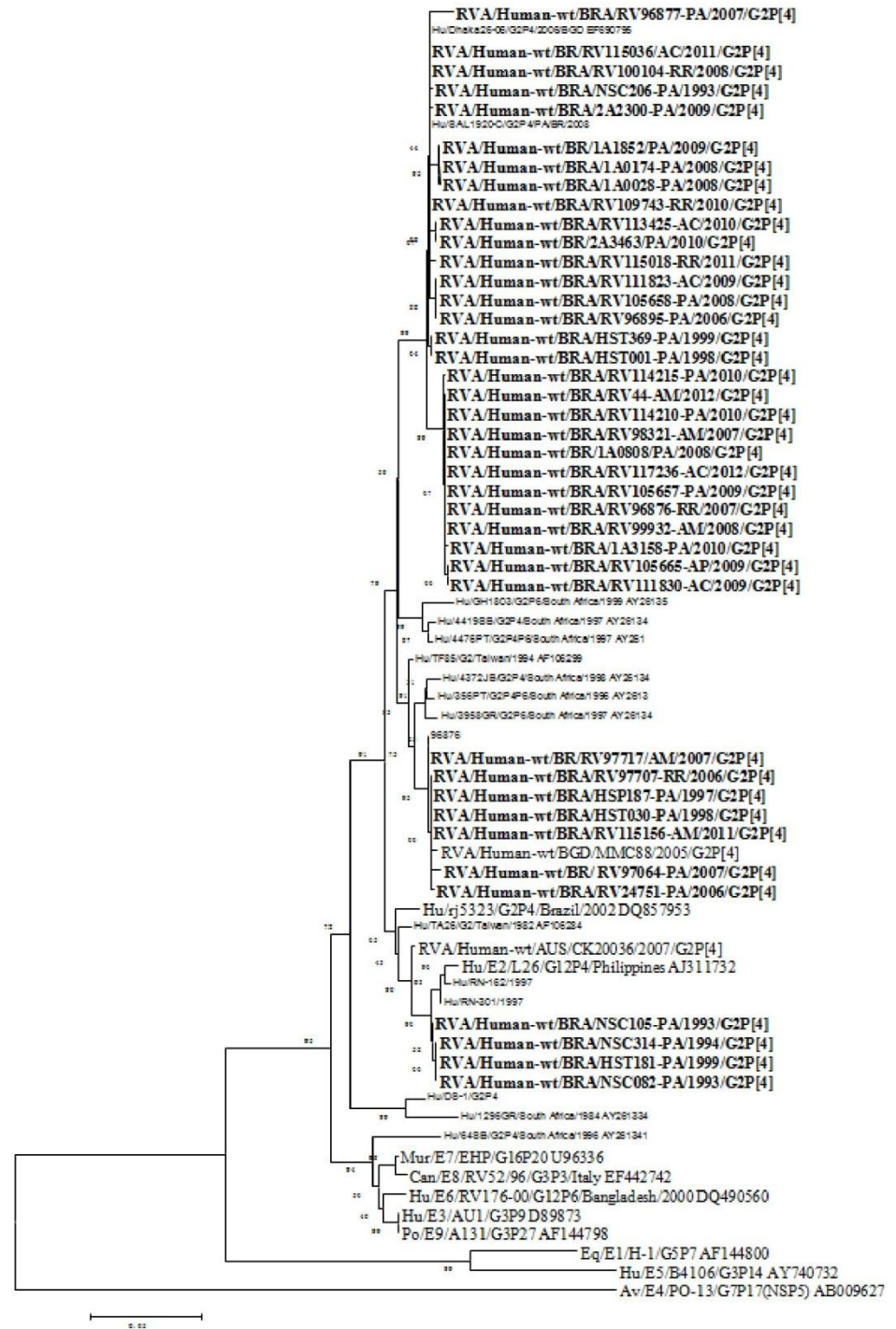
**Figure 9:** Phylogenetic analysis based on the nucleotide sequence of the coding region of the NSP2 protein from RVA genotype G2 samples collected over 20 years in the Amazon region and on sequence prototypes representative of samples of human and animal origin. Bootstrap values (1000 replicates) are indicated at the nodes of the tree.

Phylogenetic analysis of our samples identified T2 NSP3 line, with 99% similarity with Brazilian samples, Bangladesh, and US, China, Australian that circulated in the same period as ours. 2008 samples were 97% similar to strain MMC88 NSP2 gene is similar to goat.



273  
 274 **Figure 10:** Phylogenetic analysis based on the nucleotide sequence of the coding region of the NSP3 protein  
 275 from RVA genotype G2 samples collected over 20 years in the Amazon region and on sequence prototypes  
 276 representative of samples of human and animal origin. Bootstrap values (1000 replicates) are indicated at the  
 277 nodes of the tree.  
 278

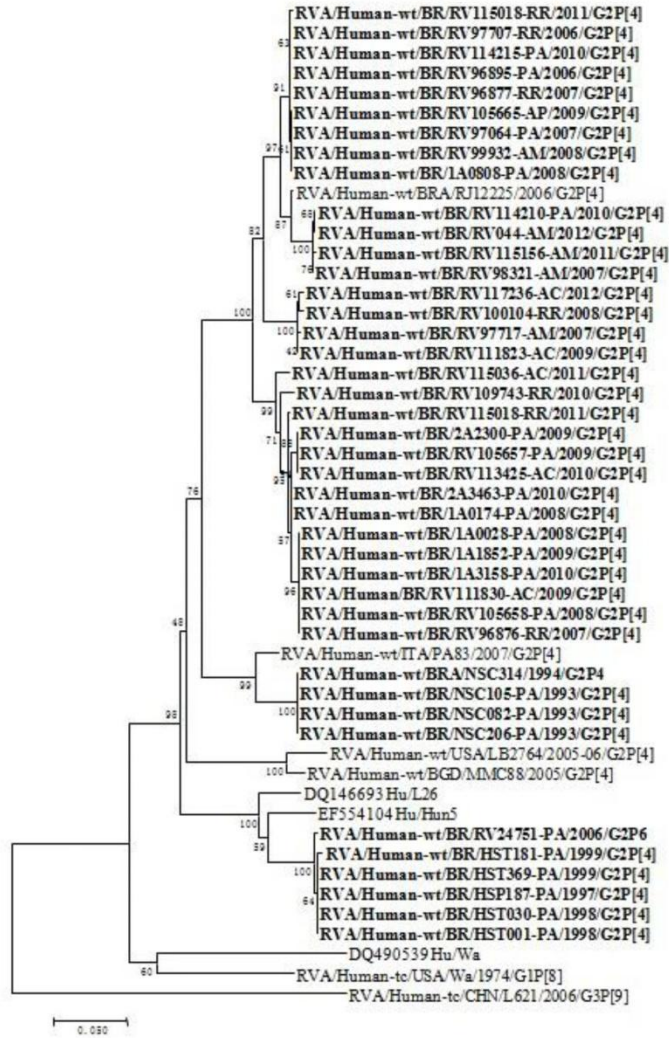
279  
 280 The NSP4 gene in the pooled samples E2 strain, showing Nucleotide identities of 85-100%  
 281 and is subdivided between clusters of lines VI, X and XII. Samples collected in 2008 and  
 282 2012 were similar (95-99%) of the samples quilombola origin and of indigenous origin. The  
 283 RV47 sample showed similarity of 98% to MMC6 sample caprine origin.  
 284



285  
286  
287

**Figure 11:** Phylogenetic analysis based on the nucleotide sequence of the coding region of the NSP4 protein from RVA genotype G2 samples collected over 20 years in the Amazon region and on sequence prototypes

288 representative of samples of human and animal origin. Bootstrap values (1000 replicates) are indicated at the  
 289 nodes of the tree.  
 290  
 291 Phylogenetic analysis of NSP5 protein identified the H2 strain showing 99% similarity with  
 292 Brazilian samples, Bangladesh, and US, China, Australian that circulated in the same period  
 293 as ours.  
 294



295  
 296 **Figure 12:** Phylogenetic analysis based on the nucleotide sequence of the coding region of the NSP5 protein  
 297 from RVA genotype G2 samples collected over 20 years in the Amazon region and on sequence prototypes  
 298 representative of samples of human and animal origin. Bootstrap values (1000 replicates) are indicated at the  
 299 nodes of the tree.  
 300  
 301

#### 302 4. Discussion

303 Little is known about the genetic diversity of the rotavirus G2 genotype and whether (or how)  
304 its evolutionary mechanisms have influenced the effectiveness of currently marketed  
305 vaccines. It is of fundamental importance to elucidate these mechanisms, especially given the  
306 extended presence of this genotype in vaccinated and unvaccinated populations.  
307 This study showed that aa positions 75, 113, 125, 129, 178 and 213 of the VP7 protein were  
308 frequently altered. A substitution in position 75, which is located in VR5 (proline region),  
309 may have led to modifications of the basic structural characteristics of the protein (ZAO et al.,  
310 1999). The aa at position 213 is located in the antigenic region C, and differences in this  
311 residue can lead to loss of recognition of G2 specific Mab (monoclonal antibody) epitopes  
312 (Coulson et al., 1996). Mutations in this region have often been associated with increased  
313 resistance to neutralizing antibodies (Zade et al., 2008; Iturriza-Gomara et al., 2001). The  
314 samples from VP7 of lineage III showed changes in three antigenic regions, A (aa 87), C (aa  
315 213) and F (aa 241 and aa 242), being 98% similar to samples detected by Pic and Palombo  
316 (1996). These results are similar to those reported by Arista et al. (2005) in samples collected  
317 from Italy in 1993 and from 1996-1997. This lineage was also detected in samples from  
318 Belém, Pará in 1999 (Mascarenhas et al., 2007) and Rio de Janeiro in 2002 (Araújo et al.,  
319 2007).

320 A substitution at aa 96 (D→N), located in the antigenic region A and VR5, was present in  
321 lineage II samples, specifically sub-lineages IIa and IIc. Studies have reported that this  
322 substitution leads to a modification of the electrical charge, which may result in a  
323 conformational change of the epitopes recognized by neutralizing antibodies (Lazdiņš et al.,  
324 1995; ZAO et al., 1999; Iturriza-Gomara et al., 2001). It has been proposed that antigenic  
325 regions A and C, which are distant in the linear sequence of the molecule, interact closely by  
326 folding of the VP7 protein (Iturriza-Gomara et al., 2001). Thus, substitution of aa 96 (D → N)  
327 is likely the reason why these strains are not recognized by neutralizing antibodies. All  
328 samples with a substitution at position 96 also had a substitution at position 87, a result  
329 similar to that found by Iturriza-Gómara et al. (2001), Gomez et al. (2014) and Dennis (2014).  
330 A substitution at position 96 of the VP7 gene was detected predominantly in samples  
331 collected from 2006 to 2012. However, this substitution was also identified in sample  
332 NSC206 collected in 1993. This suggests that this mutation likely arose in the early 1990s,  
333 equipping sub-lineage IIc with a tool to escape host defences. It may not have been prevalent  
334 in this period due to a G2 outbreak caused by the IId lineage. However, since 2006, under  
335 conditions dominated by the introduction of the vaccine, which possibly triggered a selective  
336 pressure among strains of RVA with changes in the virus ecology, the substitution at position  
337 96 of VP7 became more frequent. These findings corroborate the analysis by Dennis et al.  
338 (2014) in which they suggest that the IIc sub-lineage arose between 1985 and 1991, with the  
339 most common ancestor circulating in 1999. The present study sample was detected in 1993,  
340 thus becoming the oldest ancestor detected. The results presented here are similar to those  
341 reported by Zao et al. (1999), Iturriza-Gómara et al. (2001), Arista et al. (2005), Mascarenhas  
342 et al. (2010), Gomez et al. (2014) and Dennis et al. (2014). This substitution can therefore be  
343 considered an escape mutation from antibodies that occurred independently of the  
344 introduction of the vaccine and is geographically dispersed.

345 In VP7 of sublineage IIa, which occurred from 2006 to 2011 in all the states included in this  
346 study, significant changes were detected in amino acids at positions 87 and 96 (antigenic  
347 region A), 213 (antigenic region C) and 242 (antigenic region F). This sub-strain was detected  
348 in samples from Italy between 2003 and 2004 (Arista et al., 2005) and in 2006 samples from  
349 Brazil (Mascarenhas et al., 2010).

350 The analysis of the VP1 protein showed a circulating R2 genotype and samples of the G2  
351 genotype with a profile similar to G9 and G12, as well as samples similar to others in which  
352 inter-genogroup rearrangement could be detected (Bányai et al., 2011). This similarity was  
353 observed in samples that circulated during a period when several cases of mixed infections



354 were detected in the region (Guerra et al., 2015), a fact that suggests a possible rearrangement  
355 mechanism involving samples of different genotypes that co-circulated during the same  
356 period and may have led to amino acid substitutions that influenced the transmissibility or  
357 pathogenicity of the genotype.

358 The VP2 gene proved to be well preserved, with circulation of only the C2 genotype and  
359 formation of distinct groups according to the circulation period of the samples. This feature  
360 was also observed for other genes that were analysed. The samples in the present study were  
361 similar to strains that circulated in Italy from 1996 to 2011 (Giammanco et al., 2014). Sample  
362 RV44/AM/2012 was similar to samples found in Hungary during the same period and to  
363 samples of bovine origin (Dóro et al., 2014), reinforcing the possibility that the samples  
364 analysed here have ancestors of animal origin.

365 For the VP3 and VP4 genes, samples similar to those of human origin were detected, but with  
366 a profile similar to those of goats, suggesting that the lineage of the studied samples is of  
367 animal origin. The rearrangement between strains of human and animal hosts can suddenly  
368 change the diversity by introducing a new constellation of genes (Matthijnssens et al., 2006;  
369 McDonald et al., 2009; Martella et al., 2010). Dennis et al. (2014) reported results similar to  
370 those of the present analysis.

371 The phylogenetic analysis of strains of G2P[4] revealed based on NSP1-5 showed that our  
372 samples showed different patterns of grouping according to the year in which circulated  
373 samples, which suggests the occurrence of recombination events between strains. Our results  
374 are similar to those found by Gomez et al (2014). Strains NSP3 and NSP4 showed close  
375 phylogenetic relationship with animal samples. Similar results were recently reported for  
376 strains of RVA G2P[4] detected in the US and Italy.

377 The G2 genotype was isolated in Belém do Pará and circulated for over 20 years (from 1993  
378 to 2012); it also circulated in other states in the Amazon region for over seven years (2006-  
379 2012). During this time period, this genotype predominated discontinuously at three time  
380 intervals (1992-1994, 1998-2000 and 2006-2012), followed by periods when it remained  
381 undetected. This behaviour suggests that this genotype showed a characteristic cyclical  
382 occurrence over time. However, it was observed that in the last seven years, this genotype was  
383 no longer eliminated from circulation. Since 2006, G2 has become the most frequent genotype  
384 in the region under study. However, in some periods, a decrease in its occurrence was  
385 observed, and it persisted in the population for six years. Since then, coinciding with the  
386 introduction of the RVA vaccine, this genotype stopped displaying a cyclical occurrence  
387 pattern and became more frequently detected in the population. This pattern suggests that the  
388 G2 genotype has been acquiring and incorporating changes within its proteins over time that  
389 are favourable for maintaining RVA in the population.

390 A study in Brazil showed that the Rotarix<sup>®</sup> vaccine effectively protected against the G2P  
391 strain [4] in children aged 6-11 months. However, the efficacy in children older than 12  
392 months declined, suggesting decreased immunity among this group (Correa et al., 2010).  
393 Another study conducted in Aracaju and Sergipe, Brazil showed that the RVA vaccine against  
394 the genotype G2P [4] had 89% and 95% efficacy, respectively (Gurgel et al., 2009). In a  
395 recent study performed in Belém do Pará on the effectiveness of the vaccine, it was  
396 determined that the effectiveness of Rotarix<sup>®</sup> was higher in children aged 3-11 months  
397 (Linhares et al., 2010).

398 When samples of RVA circulating in the states included in this study were compared, it was  
399 observed that they were absolutely identical. Thus, there are no strain variations between  
400 states, i.e., the strain that circulated in the state of Pará between 2006 and 2008 was identical  
401 to the strain that circulated in the other states included in this study.

402 In conclusion, the temporal analysis suggests that over the years, there have been alterations  
403 in the cyclical behaviour of the G2 genotype, with the virus constantly evolving over time to  
404 become more persistent in the population in recent years. Because many of the amino acid

405 substitutions have not been reported in the literature to date, there are no studies that estimate  
406 the impact of these changes. Thus, further research on the effects of these changes is needed,  
407 especially in poorly studied, mutated regions of the G2 genotype, taking into account their  
408 changes at the biological level and the association of these changes with possible clinical  
409 implications.

410 Acknowledgements

411 This research was supported by funds from the National Scientific and Technological  
412 Development Council (CNPq), No. 486523 / 2013-2016 process. The authors would like to  
413 acknowledge the technical assistance given by the laboratory the Virology Section of the  
414 Instituto Evandro Chagas, Health Surveillance Secretariat, Brazilian Ministry of Health.

415

416 **BIBLIOGRAPHIC REFERENCES:**

417

418 ARAÚJO IT. et al. Brazilian P[8],G1, P[8],G5, P[8],G9, and P[4],G2 rotavírus strains:  
419 nucleotide sequence and phylogenetic analysis. **J Med Virol.** Vol 79, p 995-1001, 2007.

420 ARISTA S. et al. G2 rotavírus infections in an infantile population of the South of Italy:  
421 variability of viral strains over time. **J Med Virol.** Dec;77(4):587-94, 2005.

422 BÁNYAI K. et al. Sequencing and phylogenetic analysis of the coding region of six  
423 common rotavirus strains: evidence for intragenogroup reassortment among co-circulating  
424 G1P[8] and G2P[4] strains from the United States. **J Med Virol.** 2011. 83(3):532-9.

425 BOTH, G.W., BELLAMY, A.R., MITCHELL, D.B. Rotavírus protein structure and function.  
426 **Curr Top Microbiol Immunol.** Vol 185, p 67-105, 1994.

427 CARVALHO-COSTA F.A. et al. Laboratory-based rotavírus surveillance during the  
428 introduction of a vaccination program, Brazil, 2005-2009. **Pediatr Infect Dis J.** 2011.

429 CORREA JB, et al. Effectiveness of monovalent rotavirus vaccine (Rotarix) against severe  
430 diarrhea caused by serotypically unrelated G2P[4] strains in Brazil. **J Infect Dis.** Vol 201,  
431 p363-9, 2010.

432 COULSON BS et al. Amino acids involved in distinguishing between monotypes of rotavirus  
433 G serotypes 2 and 4. **J Gen Virol.** Vol 77, p239-45, 1996.

434 DENNIS F.E. et al. Identification of novel Ghanaian G8P[6] human-bovine  
435 reassortant rotavirus strain by next generation sequencing. **PLoS One.** 2014. 27;9(6)

436 DE OLIVEIRA LH, Camacho LA, Coutinho ES, Ruiz-Matus C, Leite JP. Rotavírus vaccine  
437 effectiveness in Latin American and Caribbean countries: A systematic review and meta-  
438 analysis. **Vaccine.** 2015 May 7;33 Suppl 1:A248-54.

439 DOMINGUES AL et al. Rotavirus-associated infantile diarrhea in Uberaba, Minas Gerais, on  
440 the wake of the Brazilian vaccination program. **J Clin Virol.** v;43(3):298-301, 2008.

- 443 DÓRO R. et al. Large-scale whole genome sequencing identifies country-wide spread of an  
444 emerging G9P[8] rotavirus strain in Hungary, 2012. **Infect Genet Evol.** 2014 Dec; 28:495-  
445 512.
- 446 ESPARZA-AGUILAR M. et al. Mortalidad por enfermedad diarreica en menores, antes y  
447 después de la introducción de la vacuna contra el rotavirus. *Salud Publica Mex [periódico na*  
448 *Internet]* 2009 [acessado 2010 fev 20]; 51(4): [p.6]. Disponível em:  
449 [http://bvs.insp.mx/rsp/\\_files/File/2009/Julio%20Agosto/2-mortalidad.pdf](http://bvs.insp.mx/rsp/_files/File/2009/Julio%20Agosto/2-mortalidad.pdf).
- 450 GENTSCH JR. et al. Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain  
451 reaction. **J Clin Microbiol.** Vol 30, p1365-73, 1992.
- 452 GIAMMANCO G.M. et al. Evolution of DS-1-like human G2P[4] rotaviruses assessed by  
453 complete genome analyses. **J Gen Virol.** 2014 Jan;95(Pt 1):91-109.
- 454 GUERRA SFS et al. Rotavirus Strain Surveillance for Three Years Following the  
455 Introduction of Rotavirus Vaccine into Belém, Brazil. **J Med Virology.** 87(8):1303-10.  
456 2015.
- 457 GURGEL, R. Q. et al. Predominance of rotavírus P[4]G2 in a vaccinated population, Brazil.  
458 **Emerg. Infect Dis**, v. 13, p. 1571-1573, 2007.
- 459 GÓMEZ MM. Prevalence and genomic characterization of G2P[4] group A **rotavírus** strains  
460 during monovalent vaccine introduction in Brazil. **Infect Genet Evol.** 2014 Dec;28:486-94.
- 461 GURGEL RQ. et al. Rotavírus genotypes circulating in Brazil before national rotavírus  
462 vaccination: a review. **J Clin Virol.** Sep;43(1):1-8. 2008.
- 463 ITURRIZA-GÓMARA, M. et al. Reassortment in vivo: driving force for diversity of human  
464 rotavirus strains isolated in the United Kingdom between 1995 and 1999. **J. Virol.**, v.75, n.8,  
465 p. 3696-3705, 2001.
- 466 JUSTINO M C. et al., Effectiveness of the monovalent G1P [8] human rotavírus vaccine  
467 against hospitalisation for severe G2P [4] rotavírus gastroenteritis in Belém, Brazil. **Pediatr**  
468 **Infect Dis J.** V30, p 396–401, 2011.
- 469 KAPIKIAN A.Z, et al. Editors. **Fields Virology.** 4th. Philadelphia: Lippincott Williams &  
470 Wilkins; p.1787-833, 2001.
- 471 LAZDINS I. et al. Rotavirus antigenicity is affected by the genetic context and glycosylation  
472 of VP7. **Virology.** V 209, p 80-9, 1995;
- 473 LANZIERI, T. M. et al. Trends in hospitalizations from all-cause gastroenteritis in children  
474 younger than 5 years of age in Brazil before and after human rotavirus vaccine introduction,  
475 1998-2007. **Pediatr Infect Dis J**, v. 29, p. 673-675, 2010.

- 476 LEITE JPG, et al. Group A rotavírus genotypes and the ongoing Brazilian experience -A  
477 Review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Vol. 103, p745-753, 2008.
- 478 LINHARES, A. C. et al. A short report on highlights of word-wide development of RIX4414:  
479 a Latin American experience. **Vaccine**, p. 3784-3785, 2006.
- 480 LINHARES A.C., BRESEE J.S. Rotavirus vaccines and vaccination in Latin America. **Rev**  
481 **Panam Salud Publica**, V8, p 305-3, 2000.
- 482  
483 LINHARES AC, et al. Effectiveness of the human rotavírus vaccine against hospitalization  
484 for severe rotavírus gastroenteritis in Belém, Brazil. **ESPID**. 2010.
- 485 LI K. et al. Identification of novel and diverse rotaviruses in rodents and insectivores, and  
486 evidence of cross-species transmission into humans. **Virology**. 2016. 494:168-77.
- 487 MCDONALD S.M. Evolutionary dynamics of human rotaviruses: balancing reassortment  
488 with preferred genome constellations. **PLoS Pathog**. 2009 Oct;5(10)
- 489 MARTELLA V. et al. Zoonotic aspects of rotaviruses. **Vet Microbiol**. 2010 Jan 27;140(3-  
490 4):246-55.
- 491 MASCARENHAS JD, et al. Molecular characterization of VP4 and NSP4 genes from  
492 rotavírus strains infecting neonates and young children in Belém, Brazil. **Virus Res**. Vol 126,  
493 p149-58, 2007.
- 494 MASCARENHAS JD, et al. Identification of two sublineages of genotype G2 rotavírus  
495 among diarrheic children in Parauapebas, Southern Pará State, Brazil. **J Med Virol**. Vol 82,  
496 p712-9, 2010.
- 497 MATTHIJNSSENS J. et al. G8 rotavirus strains isolated in the Democratic Republic of  
498 Congo belong to the DS-1-like genogroup. **J Clin Microbiol**. 2006 May;44(5):1801-9.
- 499 MATTHIJNSSENS J. et al. Uniformity of rotavírus strain nomenclature proposed by the  
500 Rotavírus Classification Working Group (RCWG). **Arch Virol**. V156: 1397–1413. 2011.
- 501 MORILLO SG, et al. Characterization of rotavirus strains from day care centers: pre- and  
502 post-rotavirus vaccine era. **J Pediatr**. V86, p155-8, 2010.
- 503 MUNFORD V, et al. Rotavírus gastroenteritis in children in 4 regions in Brazil: a hospital-  
504 based surveillance study. **J Infect Dis**. Vol 200, pS106-13, 2009.
- 505 NAKAGOMI T. et al. Apparent extinction of non-G2 rotavírus strains from circulation in  
506 Recife, Brazil, after the introduction of rotavírus vaccine. **Arch Virol**. 153:591–593, 2008.
- 507 OLIVEIRA A. S.L., et al. Rotavírus serotype distribution in northern Brazil trends over a 27  
508 year period pre and post national vaccine introduction. **Trials in Vaccinol**. V 1:4–9, 2012.

- 509   PIEC TL, PALOMBO EA. Sequence comparison of the VP7 of serotype G2 rotaviruses from  
510   diverse geographical locations. **DNA Seq.** 1998;9(5-6):369-73.
- 511   ROTAVIRUS CLASSIFICATION WORKING GROUP (RCWG). 2015. Newly assigned  
512   genotypes. (<https://rega.kuleuven.be/cev/viralmetagenomics/virus-classification/rcwg>).
- 513   TATE JE et al. Remaining issues and challenges for rotavirus vaccine in preventing global  
514   childhood diarrheal morbidity and mortality. **Expert Rev Vaccines.** 2012, Feb;11(2):211-20.
- 515   TROJNAR E. et al. Identification of an avian group A rotavirus containing a novel VP4 gene  
516   with a close relationship to those of mammalian rotaviruses. **J Gen Virol.** 2013 Jan;94(Pt  
517   1):136-42.
- 518   VARGHESE V, Ghosh S, Das S, Bhattacharya SK, Krishnan T, Karmakar P, Kobayashi N,  
519   Naik TN. Characterization of VP1, VP2 and VP3 gene segments of a human rotavirus closely  
520   related to porcine strains. **Virus Genes.** 2006. 32(3):241-7.
- 521   ZAO CL et al. . Sequence analysis of VP1 and VP7 genes suggests occurrence of a  
522   reassortant of G2 rotavirus responsible for an epidemic of gastroenteritis. **J Gen Virol.** Vol  
523   80, p1407-15, 1999.
- 524   ZADE JK, CHHABRA P, CHITAMBAR SD. Characterization of VP7 and VP4 genes of  
525   rotavirus strains: 1990-1994 and 2000-2002. **Epidemiol Infect.** V137, p936-42, 2009.
- 526

## 7 Discussão

7.1 Distribuição de sorotipos de Rotavírus circulantes na região Norte no período pré e pós vacina (artigo 1).

Os RVA apresentam ao longo de sua história variações na circulação de genótipos, muitas desses genótipos também exibem peculiaridades com relação a região geográfica em que circulam. Essas variações se devem a diversidade genética apresentada por esse vírus, originando um número grande de genótipos o que facilita a transmissão e resistência do vírus, tanto em humanos como em animais (MATTHIJNSSENS et al., 2012). O monitoramento da circulação dos diferentes genótipos circulantes na população é de fundamental importância para elaborar padrões de flutuação temporal e geográfica de cada genótipo, permitindo assim detectar possíveis ameaças às estratégias vacinais implantadas em muitos países.

A realização de vários estudos e ensaios de vacina durante quase três décadas, permitiu uma avaliação da diversidade de cepas de rotavírus que circularam ao longo do tempo na região norte do Brasil.

Nossos resultados com relação a diversidade de RVA circulantes mostram uma expressiva variação de cepas que circularam no norte do Brasil ao longo de 27 anos, particularmente quando se considera os dados dos estudos realizados entre 1981 e 2005. Nosso estudo mostrou que o sorotipo G1 foi a de maior detecção (42,9%) em todo o estudo e esteve presente durante todo o período de análise, resultado que é semelhante aos detectados em outras regiões do Brasil e a nível mundial (SANTOS et al., 2005; GURGEL et al., 2008; LEITE et al., 2008).

Para o tipo G2 de RVA foi identificado um padrão cíclico de ocorrência, padrão este também detectado em outras regiões do Brasil e em outros países (GUSMÃO et al., 1999; LINHARES 2000; PAGE, STEELE 2004 ). Um importante resultado encontrado em nosso estudo foi a reemergência do tipo G2 no período de 2006 a 2008, onde sua detecção atingiu taxas de 91%, fato este que refletiu em toda América Latina, mesmo em países que não haviam introduzido a vacina contra RVA em seu território (AMARILLA et al., 2007; LINHARES et al., 2011), tornando-se ainda um fenômeno mundial (PATEL et al., 2008, ESTEBAM et al., 2010).

Isto sugere que a predominância do G2 na região Norte do Brasil e em outras partes do país, provavelmente, refletem uma flutuação devido à variação natural

ao longo do tempo. Variação essa que podemos demonstrar neste artigo, onde este genótipo foi detectado em surtos, se mostrando prevalente por aproximadamente um ou dois anos e passando então mais de cinco anos sem ser detectado para posterior resurgir novamente.

Pouco ainda se sabe sobre a diversidade genética de cepas de rotavírus G2 e de que forma seus mecanismos de evolução podem estar ou não envolvidos na eficácia das vacinas atualmente comercializadas, sendo de fundamental importância estudos que tentem elucidar esses mecanismos, principalmente após um período de grande ocorrência deste genótipo na população vacinada e não vacinada.

## 7.2 Análise molecular de Rotavírus G2 no período pré e pós vacina (ARTIGO 2).

Após a introdução da vacinação contra o RVA passou-se a detectar o genótipo G2 de forma crescente no Brasil e em outros países que também implantaram a vacina monovalente em seu calendário de vacinação (GURGEL et al., 2007; MASCARENHAS et al., 2007; NAKAGOMI et al., 2008; LEITE et al., 2008; MUNFORD et al., 2009; KIRKWOOD et al., 2009; PATEL et al., 2009; JUSTINO et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2012; GUERRA et al., 2015). Vale ressaltar que o genótipo G2 é o único representante da constelação *DS-I-like*. Os demais genótipos são *Wa-like* (G1P[8], G3P[8], G4P[8], G9P[8], e G12P[8]) (MATTHIJNSSENS, VAN RANST, 2012). O surgimento deste genótipo em cenário de pós implantação da vacina e o fato da proteção conferida contra o tipo G2 ser menor (RUIZ-PALACIOS et al., 2006; VESIKARI et al., 2007; LINHARES et al., 2008; JUSTINO et al., 2011), levantou postulações que sugeriam haver uma pressão vacinal a qual selecionou a cepa G2P[4].

Nossos resultados (artigo 1 e 2) ratificam uma maior circulação do tipo G2P[4] no período de pós implantação da vacina na região Norte. A análise das cepas circulantes ao longo do período investigado permite observar para a proteína VP7 que as amostras se agrupam em linhagens e sublinhagens distintas de acordo com o período de detecção, existindo uma estreita relação entre as cepas circulantes em outros países no mesmo período.

A dedução de aminoácidos para o gene VP7 mostrou que nas posições 75, 113, 125, 129 178 e 213 há frequentes mutações. A alteração na posição aa 75, a qual pertence a VR5 (região de prolina) pode acarretar modificações das características

estruturais básicas (ZAO et al., 1999). O aa 213 está localizado na região antigênica C, e diferenças neste resíduo estão relacionadas com perda de reconhecimento de epítomos específicos por monotipos específicos G2 Mabs (COULSON et al., 1996). A substituição de aa 96 (Asp→Asn), localizada na região antigênica A e VR5, esteve presente em amostras da linhagem II, sub-linhagem IIa e IIc. Estudos têm relatado que essa alteração induz a uma mudança na carga elétrica, podendo resultar em uma alteração conformacional dos epítomos reconhecidos por anticorpos neutralizantes (LAZDINS et al., 1995; ZAO et al., 1999; ITURRIZA-GÓMARA et al., 2001). Foi proposto que as regiões antigênicas A e C, que estão distantes na molécula linear interagem estreitamente dobrando na forma da molécula VP7 (ITURRIZA-GÓMARA et al., 2001). Assim, a substituição de aa 96 (Asp→Asn) é a provável responsável por um escape destas cepas a anticorpos de neutralização. Todas as amostras com alteração na posição aa 96, também tiveram alteração na posição aa 87, resultado semelhante ao encontrado por Iturriza-Gómara et al (2001), Gomez et al (2014) Dennis (2014).

A alteração na posição aa 96 do gene VP7 foi detectada predominantemente em amostras de 2006 a 2012. Entretanto, essa alteração foi identificada em uma amostra proveniente do ano de 1993 (NSC206). Esse fato sugere que esta mutação provavelmente surgiu no início da década de 90, conferindo a sublinhagem IIc uma ferramenta de escape às defesas do hospedeiro e que talvez não tenha sido prevalente nesse período devido a um surto de G2 causado pela linhagem IID neste mesmo período, mas a partir de 2006, essa alteração tornou-se permanente neste genótipo ocasionando mudança na ecologia do vírus que favoreceram a manutenção deste tipo na população. Esses achados corroboram com a análise feita por Dennis et al., 2014 no qual ele sugere que a sublinhagem IIc tenha surgido entre os anos de 1985 a 1991, onde o mesmo encontrou um ancestral mais comum circulando em 1999, sendo que nossa amostra foi detectada em 1993, tornando-se então o ancestral mais antigo detectado. Nossos resultados são semelhantes aos encontrados por Zao et al (1999), Iturriza-Gómara et al (2001), Arista et al (2005), Mascarenhas et al (2010), Gomez et al (2014), Dennis et al (2014). Essa alteração pode, portanto, ser considerada como uma mutação de escape a anticorpos que ocorreu independente da introdução da vacina e encontra-se dispersa geograficamente.

A comparação das sequências de aminoácidos dos sítios antigênicos das proteínas VP7 e VP4 da cepa vacinal de Rotarix® e as amostras G2P[4] deste estudo,



revelou que a maioria das mudanças observadas foram mantidas nas nossas amostras ao longo dos anos, estando todas presentes antes da introdução da vacina Rotarix®.

Nossos resultados reforçam a tese defendida de que fatores ligados a evolução genética do vírus que não estão relacionados a introdução da vacina seriam responsáveis pelo aumento na prevalência de G2P[4] no Brasil e em outros países que também introduziram a vacina em seus calendários oficiais de vacinação. Apoiando assim a proposta de que o tipo G2 reemerge em ciclos periódicos (BISHOP et al., 1991) que são favorecidos por acumulação de indivíduos imunologicamente susceptíveis (CARVALHO-COSTA et al., 2009; ASSIS et al., 2013).

A análise das proteínas estruturais e não estruturais revelou a existência de um padrão comum de circulação para nossas amostras apesar de diversas variantes virais terem circulado no período estudado, e de algumas apresentarem semelhança com amostras que possuíam ancestralidade animal. De acordo com o padrão de agrupamento apresentado pelas amostras para os genes estruturais e não estruturais podemos perceber que algumas amostras permanecem nos mesmos *clusters* independente do gene analisado, sugerindo um baixo índice de reagrupamento.

O alinhamento de aa para a NSP4 revelou a ocorrência de substituições de aa nos três sítios antigênicos descritos (BORGAN et al. 2003), e na região variável interespécie (aa 135 – 141) (MOHAN, ATREYA. 2000). Algumas destas substituições se localizaram no domínio citoplasmático da proteína, onde encontram-se os sítios de união a VP4 e VP6.

Nossos dados evidenciam um grau de variabilidade genética do RVA tipo G2. Os RV-A apresentam um alta taxa de variação genética que tendem a se acumular ao longo dos anos, propiciando o surgimento de novas linhagens e sublinhagens o que favorece a manutenção deste vírus na população.

Nosso estudo mostrou perfis de segregação independente para os genes que codificam para as proteínas VP7, VP4, VP6 e NSP4. Esses dados também foram encontrados em vários estudos a nível mundial. Os dados obtidos revelaram que a variabilidade do genótipo G2P[4] no Brasil esta altamente influenciada pela ocorrência de mutações pontuais e *reassortment*, tanto entre amostras humanas quanto entre amostras humanas e amostras animais. Como pode ser observado nas árvores de VP4 e VP7, as amostras que circularam no Brasil no período de 1993 a 2012 não formaram um grupo monofilético, e sim agruparam-se em separado, formando várias linhagens e sublinhagens, mostrando relações filogenéticas próximas com amostras que circularam

em diferentes regiões do Brasil e do mundo e que foram detectadas em diferentes anos. Este padrão filogenético indica o fluxo de variantes virais que ocorre em nível global, mostrando a entrada e saída de variantes de RV-A genótipo G2P[4] no Brasil.

Quando analisamos comparativamente amostras circulantes entre os Estados participantes, podemos notar que essas amostras são absolutamente idênticas entre si, não havendo, portanto, variação de cepas entre estados envolvidos no estudo.

## 8 CONCLUSÃO

- A análise temporal sugere que este genótipo vem apresentando modificações em seu comportamento cíclico ao longo dos anos em estudo, demonstrando que ele vem sofrendo constante evolução que o tornou mais persistente na população nos últimos anos.

- Todas as amostras G2P[4] para as quais foram analisados os onze segmentos gênicos apresentaram uma constelação gênica *DS-1-like*: I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2, apesar de que diversas variantes virais circularam no período estudado.

- Não foram observadas diferenças significativas nos sítios antigênicos das proteínas VP8\* e VP7 entre crianças vacinadas e não vacinadas.

- Muitas alterações ao nível de aminoácidos não foram, até o momento, relatados pela literatura, não possuindo estudos que possam estimar o valor dessas mudanças.

- Há necessidade de investigações mais apuradas sobre alterações em regiões de mutação pouco conhecidas, suas alterações a nível biológico associados a possíveis implicações clínicas.

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- ABE M. et al. Molecular epidemiology of rotaviruses among healthy calves in Japan: Isolation of a novel bovine rotavirus bearing new P and G genotypes. **Virus Res.** Vol. 144, p 250–7, 2009.
- AFRIKANOVA I. et al. Phosphorylation generates different forms of rotavirus NSP5. **J Gen Virol.** 77(Pt 9):2059–2065, 1996.
- AHMED K; NAKAGOMI T; NAKAGOMI O. Isolation and molecular characterization of a naturally occurring non-structural protein 5 (NSP5) gene reassortant of group A rotavirus of serotype G2P[4] with a long RNA pattern. **Journal of Medical Virology.** Vol 77, p 323-30, 2005.
- AHMED K. et al. Molecular characterization of VP7 gene of human rotaviruses from Bangladesh. **Virus Genes.** Vol 40, p347-56, 2010.
- AMARILLLA A . et al. Rotavirus infection in the Paraguayan population from 2004 to 2005, high incidence of rotavirus strains with short electropherotype in children and adults, **Med. Sci. Monit.** 13 CR333-CR337, 2007.
- ANDERSON E.J; AND WEBER S.G. Rotavirus infection in adults. **Lancet Infect Dis.** p 91-9, 2004.
- ANDERSON E.J. et al. Impact of rotavirus vaccination on hospital-acquired rotavirus gastroenteritis in children. **Pediatrics.** V 127, p264–e270, 2011.
- ARAÚJO IT. et al. Brazilian P[8],G1, P[8],G5, P[8],G9, and P[4],G2 rotavirus strains: nucleotide sequence and phylogenetic analysis. **J Med Virol.** Vol 79, p 995-1001, 2007.
- ARIAS C.F. et al. Trypsin activation pathway of rotavirus infectivity. **J Virol.** V. 70, p 5832-9, 1996.
- ARIAS C.F. et al. Early events of rotavirus infection: the search for the receptor(s). **Novartis Found Symp.** Vol 238, p 47-60, 2001.
- ARISTA S. et al. G2 rotavirus infections in an infantile population of the South of Italy: variability of viral strains over time. **J Med Virol.** Dec;77(4):587-94, 2005.
- ARMAH, G.E., et al. Efficacy of pentavalent rotavirus vaccine against severe rotavirus gastroenteritis in infants in developing countries in sub-Saharan Africa: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. **Lancet.** V 376, p606–614, 2010.
- ARNOLD M.M.; BARRO M; PATTON J.T. Rotavirus NSP1 mediates degradation of interferon regulatory factors through targeting of the dimerization domain. **J Virol.** Sep;87(17):9813-21 2013.

- ATHERLY D, et al. Rheingans RD. Rotavirus vaccination: cost-effectiveness and impact on child mortality in developing countries. *J Infect Dis.* Nov 1;200 Suppl 1:S28-38, 2009.
- BAHL R. et al. Incidence of Severe Rotavirus Diarrhea in New Delhi, India, and G and P Types of the Infecting Rotavirus Strains. S114. *JID* v.192, 2005.
- BALL J.M., et al. Age-dependent diarrhea induced by a rotaviral nonstructural glycoprotein. *Science.* Apr 5;272(5258):101-4, 1996.
- BANAJEH S. M., AND BASHEER A., ABU-ASBA. The epidemiology of all-cause and rotavirus acute gastroenteritis and the characteristics of rotavirus circulating strains before and after rotavirus vaccine introduction in Yemen: analysis of hospital-based surveillance data. *BMC Infect Dis.*; 15: 418, 2015.
- BÁNYAI K. et al. Sequencing and phylogenetic analysis of the coding region of six common rotavirus strains: evidence for intragenogroup reassortment among co-circulating G1P[8] and G2P[4] strains from the United States. *J Med Virol.* 83(3):532-9, 2011.
- BANYAI G, et al. Mediator can regulate mitotic entry and direct periodic transcription in fission yeast. *Mol Cell Biol.* Nov;34(21):4008-18, 2014.
- BENATI F.J., et al. Multiple-gene characterization of **rotavirus** strains: evidence of genetic linkage among the VP7-, VP4-, VP6-, and NSP4-encoding genes. *J Med Virol.* 82(10):1797-802, 2010.
- BERNSTEIN D.I., et al. Evaluation of WC3 rotavirus vaccine and correlates of protection in healthy infants. *J Infect Dis.* Nov;162(5):1055-62, 1990.
- BERNSTEIN D.I., et al. Rotavirus overview. *Pediatr Infect Dis J.* Vol 28, p. S50-3,
- BICAN, P. et al. Purification and characterization of bovine rotavirus cores; *J Virol*, vol 43, p1113-7, 1982, 2009.
- BEROIS M, et al. Rotavirus nonstructural protein NSP5 interacts with major core protein VP2. *J Virol.* 77:1757–1763, 2003.
- BICAN P, COHEN J, CHARPILLENNE A, SCHERRER R. Purification and characterization of bovine rotavirus cores. *J Virol.* Sep;43(3):1113-7, 1982.
- BISHOP, R.F., Natural history of human rotavirus infection. *Archives of Virology.* 12: 119-128, 1996.
- BLACKHALL J, et al. Analysis of rotavirus nonstructural protein NSP5 phosphorylation. *J Virol.* 72:6398–6405, 1998.

BLOMQUIST M, et al. Rotavirus infections and development of diabetes-associated autoantibodies during the first 2 years of life. **Clin Exp Immunol**. Vol. 128, p511-5, 2002.

BLUTT S.E., et al. Rotavirus antigenaemia and viraemia: a common event? **Lancet**. Vol. 362, p1445-9, 2003.

BLUTT S.E., et al. Rotavirus antigenemia in children is associated with viremia. **PLoS Med**. vol 4, p121, 2007.

BOOM, J.A., et al. Sustained protection from penta-valent rotavirus vaccination during the second year of life at a large, urban United States pediatric hospital. **Pediatr. Infect. Dis. J**. V 29 , p1133–1135, 2010.

BOSHUIZEN, J.A. et al. Changes in small intestinal homeostasis, morphology, and gene expression during rotavirus infection of infant mice. **J. Virol**. Vol 77, p13005–13016, 2003.

BOTH G.W., et al. Rotavirus protein structure and function. **Curr Top Microbiol Immunol**. Vol 185, p 67-105, 1994.

BOWMAN G.D., et al. Crystal structure of the oligomerization domain of NSP4 from rotavirus reveals a core metal-binding site. **J Mol Biol**. Dec 15;304(5):861-71, 2000.

BUCARDO F, et al. Predominance of norovirus and sapovirus in Nicaragua after implementation of universal rotavirus vaccination. **PLoS ONE**. V 9, 2014.

BUTTERY J.P., et al. Reduction in rotavirus-associated acute gastroenteritis following introduction of rotavirus vaccine into Australia's National Childhood vaccine schedule. **Pediatr. Infect. Dis. J**. V 30, p25–29, 2011.

CARNEIRO N.B., et al. Clinical and epidemiological aspects of children hospitalized with severe rotavirus-associated gastroenteritis in Salvador, BA, Brazil. **Braz J Infect Dis**. Dec;9(6):525-8, 2005.

CARVALHO-COSTA F.A., et al. Laboratory-based rotavirus surveillance during the introduction of a vaccination program, Brazil, 2005-2009. **Pediatr Infect Dis J**. 2011.

CARTER M.J., Enterically infecting viruses: pathogenicity, transmission and significance for food and waterborne infection. **Journal of Applied Microbiology**. 98: 1354-1380, 2005.

CASOLA A, et al. Rotavirus infection of cultured intestinal epithelial cells induces secretion of CXC and CC chemokines. **Gastroenterology**. May;114(5):947-55, 1998.

CDC. Prevention of rotavirus gastroenteritis among infants and children recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). **MMWR**; 58(RR02):1-25, 2009.

CECÍLIO A.B., et al. Screening of Brazilian medicinal plants for antiviral activity against rotavirus. **J Ethnopharmacol**. Jun 14;141(3):975-81, 2012.

CEZARD JP, SALAZAR-LINDO E. Racecadotril in acute diarrhea. **Indian Pediatr**. May;42(5):502-3, 2005.

CHARPILLENNE A, et al. Identification of rotavirus VP6 residues located at the interface with VP2 that are essential for capsid assembly and transcriptase activity. **J Virol**. Aug;76(15):7822-31, 2002.

CHRYSTIE IL, TOTTERDELL BM, BANATVALA JE. Asymptomatic endemic rotavirus infections in the newborn. **Lancet**. Vol 1, p1176-8. 1978.

CHUNG J.Y., Detection of Rotavirus Genotypes in Korea 5 Years after the Introduction of Rotavirus Vaccines. **J Korean Med Sci**. Oct;30(10):1471-5, 2015.

CIARLET M, et al. Species specificity and interspecies relatedness of NSP4 genetic groups by comparative NSP4 sequence analyses of animal rotaviruses. **Arch Virol**. 145(2):371-83, 2000.

CIARLET M, HYSER J.M., ESTES M.K., Sequence analysis of the VP4, VP6, VP7, and NSP4 gene products of the bovine rotavirus WC3. **Virus Genes**. Mar;24(2):107-18, 2002.

CLARK, H.F., et al. Diverse serologic response to rotavirus infection of infants in a single epidemic. **Pediatr Infect Dis**. vol 4, p626-631, 1985.

CLARK J.D., HILL SM, PHILLIPS AD. Investigation of hospital-acquired rotavirus gastroenteritis using RNA electrophoresis. **J Med Virol**. Nov;26(3):289-99, 1988.

CLARK H.F., Et al. Safety, immunogenicity and efficacy in healthy infants of G1 and G2 human reassortant rotavirus vaccine in a new stabilizer/buffer liquid formulation. **Pediatr Infect Dis J**. Oct;22(10):914-20, 2003.

CLARK H.F., et al. Distribution of rotavirus genotypes causing nosocomial and community-acquired acute gastroenteritis at the Children's Hospital of Philadelphia in the new rotavirus vaccine era. **Hum Vaccin**. Nov;7(11):1118-23, 2011.

COOK S.M., GLASS R.I., LEBARON C.W. Global seasonality of rotavirus infections. **Bull World Health Organ**.; 68(2):171-7, 1990.

- CORTESE MM, et al. Reduction in Gastroenteritis in United States Children and Correlation With Early Rotavirus Vaccine Uptake From National Medical Claims Databases. **Pediatr Infect Dis J.** 2010.
- CONTIN R. et al. Rotavirus NSP5 orchestrates recruitment of viroplasmic proteins. **J Gen Virol.**, 91:1782–1793. 2010
- CORTESE, M.M., et al. Effectiveness of monovalent and pentavalent rotavirus vaccine. **Pediatrics.** V132, p25–33, 2013.
- COULSON B.S., et al. Amino acids involved in distinguishing between monotypes of rotavirus G serotypes 2 and 4. **J Gen Virol.** Feb;77 ( Pt 2 ):239-45, 1996.
- CRAWFORD S.E. et al. Rotavirus viremia and extraintestinal viral infection in the neonatal rat model. **J Virol.** May; 80(10):4820-32. 2006.
- CUNLIFFE N.A. et al. Epidemiology of rotavirus diarrhoea in Africa: a review to assess the need for rotavirus immunization. **Bull World Health Organ.** 76(5):525-37. Review. 1998.
- DENNEHY PENELOPE H. Rotavirus Vaccines: an Overview. **Clinical microbiology reviews.** p198–208, 2008.
- DENNEHY, P.H. Treatment and prevention of rotavirus infection in children. **Curr. Infect. Dis. Rep.** V: 15, p242–250. 2013.
- DENNIS F.E. Identification of novel Ghanaian G8P[6] human-bovine reassortant rotavirus strain by next generation sequencing. **PLoS One.** 27;9(6). 2014.
- DEO R.C. et al. Recognition of the rotavirus mRNA 3' consensus by an asymmetric NSP3 homodimer. **Cell,** 108:71–81. 2002.
- DE DONNO A et al. Emergence of unusual human rotavirus strains in Salento, Italy, during 2006-2007. **BMC Infect Dis.** Vol 15, p9:43. 2009.
- DE OLIVEIRA LH et al. Rotavirus vaccine introduction in the Americas: progress and lessons learned. **Expert Rev Vaccines,** vol 7, p345-53, 2008.
- DE OLIVEIRA L.H. et al. Rotavirus vaccine effectiveness in Latin American and Caribbean countries: A systematic review and meta-analysis. **Vaccine.** 7;33 Suppl 1:A248-54. 2015.
- DESAI, R, et al. All-cause gastroenteritis and rotavirus-coded hospitalizations among US children, 2000–2009. **Clin. Infect. Dis.** V 55, p28–34, 2012.
- DESSELBERGER U. Genome rearrangements of rotaviruses. **Arch Virol Suppl.** Vol 12, p37-51, 1996.



- DESSELBERGER U, ITURRIZA-GÓMARA M, GRAY JJ. Rotavírus epidemiology and surveillance. **Novartis Found Symp.** Vol 238; p125-47, 2001.
- DESSELBERGER ULRICH. Rotaviruses. **Virus Research.** 190. p75–96. 2014
- DI LERNIA V, LOMBARDI M, LO SCOCCO G. Infantile acute hemorrhagic edema and rotavirus infection. **Pediatr Dermatol.** V 21(5):548-50, 2004.
- DONÀ D.E. Community-Acquired Rotavirus Gastroenteritis Compared with Adenovirus and Norovirus Gastroenteritis in Italian Children: A Pediatric Study. **IJ of Pediatrics.** Volume 2016. 2016.
- DONATO, C.M., et al. Characterization of G2P[4] rotavírus strains associated with increased detection in Australian states using the RotaTeq® vaccine during the 2010-2011 surveillance period. **Infect. Genet. Evol.** 2014.
- DÓRÓ R. et al. Large-scale whole genome sequencing identifies country-wide spread of an emerging G9P[8] rotavirus strain in Hungary, 2012. **Infect Genet Evol.** v28, p495-512. 2014
- DULGHEROFF, A. C. Distribution of rotavirus genotypes after vaccine introduction in the Triângulo Mineiro region of Brazil: 4-Year follow-up study. **Journal of Clinical Virology**, v.55, n.1, p.67-71. 2012.
- DULGHEROFF AC, et al. Changes in epidemiology of rotavírus in the Triângulo Mineiro region of Brazil: lack of two consecutive rotavírus seasons. **Braz J Med Biol Res.** Dec;47(12):1091-5, 2014.
- EBRAHIM GJ. Rotaviruses and rotavirus vaccines. **J Trop Pediatr.** v54(2):79-82. 2008
- ESTEBAN L.E. et al. Molecular epidemiology of group A rotavirus in Buenos Aires, Argentina 2004-2007: reemergence of G2P[4] and emergence of G9P[8] strains. **J Med Virol.** v 82, p108393–108393. 2010.
- ESTES MK, GRAHAM DY, MASON BB. Proteolytic enhancement of rotavírus infectivity: molecular mechanisms. **J Virol.** v39(3), p879-88, 1981.
- ESTES MK, COHEN J. Rotavírus gene structure and function. **Microbiol Rev.** 53(4):410-49, 1989.
- ESTES, M. K. e MORRIS, A. P. A viral enterotoxin. A new mechanism of vírus induced pathogenesis. **Advances in Experimental Medicine and Biology.** vol 473, p73-82, 1999.

- ESTES, M.K. Rotavírus and their replication, p. 1747-1785. *In* D.M. Knipe and P.M. Howley (eds), Fields. **Virology**, 4th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins. 2001.
- ESTES, M. K.; KAPIKIAN, A. Z. RotavíruSES. *In*: Knipe, D. M.; Howley, P. M.; Griffin, D. E., editors. **Virology**. 5<sup>th</sup> ed Philadelphia, PA: Lippincott. Williams and Wilkins, p. 1917-1957, 2007.
- FABBRETTI E. et al. Two non-structural rotavirus proteins, NSP2 and NSP5, form viroplasm-like structures in vivo. **J Gen Virol**. v80(Pt 2), p333–339. 1999
- FISCHER, T. K. et al. Protective immunity after natural rotavirus infection: a community cohort study of newborn children in Guinea-Bissau, west Africa. **J Infect. Dis.** Vol 186, p593–597, 2002.
- FISCHER T.K, GENTSCH JR. Rotavirus typing methods and algorithms. **Rev Med Virol**. v14(2):71-82. Review. 2004
- FINAMORE E. et al. G2 as an emerging rotavirus strain in pediatric gastroenteritis in southern Italy. **Infection**. v39(2), p113-9, 2011.
- FLORES J. et al. Protection against severe rotavirus diarrhoea by rhesus rotavirus vaccine in Venezuelan infants. **Lancet**. v18;1(8538):882-4, 1987.
- FLORES J, KAPIKIAN A.Z., Vaccines against viral diarrhoea. **B Clin Gastroenterol**.v 4(3):675-93. Review. No abstract available, 1990.
- FRANCO, M. A., N. FENG e H. B., GREENBERG. Molecular determinants of immunity and pathogenicity of rotavirus infection in the mouse model. **J Infect. Dis.** Vol 174, pS47–S50, 1996.
- FRANCO, M. A., C. TIN, e H. B. GREENBERG. CD8 T cells can mediate almost complete short-term and partial long-term immunity to rotavirus in mice. **J Virol**. Vol 71, p4165–4170, 1997.
- FRANCO, M. A.; ANGEL, J.; GREENBERG, H. B. Immunity and correlates of protection for rotavirus vaccines. **Vaccine**, v. 24, p.2718 –2731, 2006.
- FREITAS E.R. et al. Occurrence of group A rotavirus mixed P genotypes infections in children living in Goiânia-Goiás, Brazil. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**. Vol 27, p1065-9, 2008.
- FUJII Y, et al. Genome Sequences of Rotavirus A Strains Ty-1 and Ty-3, Isolated from Turkeys in Ireland in 1979. **Genome Announc**. 2016.

GASTÁNADUY, P.A. et al. Gastroenteritishospitalizations in older children and adults in the United States before and after implementation of infant rotavirus vaccination. **JAMA**. V 310, p851–853, 2013.

GENTSCH J.R. et al. Serotype diversity and reassortment between human and animal rotavirus strains: implications for rotavirus vaccine programs. **J Infect Dis**. v192(Suppl. 1):S146–59. 2005.

GIAQUINTO, C. et al. Summary of effectiveness and impact of rotavirus vaccination with the oral pentavalent rotavirus vaccine: a systematic review of the experience in industrialized countries. **Hum. Vaccin**. V 7, p734–74, 2011.

GHOSH S, KOBAYASHI N. Whole-genomic analysis of **rotavirus** strains: current status and future prospects. **Future Microbiol**. v6(9):1049-65. 2011.

GLASS R.I. et al. Rotavirus vaccines: current prospects and future challenges. **Lancet**. V 368, p.323-368, 2006.

GLEIZES O. et al. Nosocomial rotavirus infection in European countries: a review of the epidemiology, severity and economic burden of hospital-acquired rotavirus disease. **Pediatr Infect Dis J**. vol 25; pS12-S21, 2006.

GÓMEZ M.M. et al. Prevalence and genomic characterization of G2P[4] group A rotavirus strains during monovalent vaccine introduction in Brazil. **Infect Genet Evol**. v28:486-94. 2014.

GORDON A.G. Rotavirus infections and the sompe syndrome. **J Infect Dis**. v146, p117-8. 1982.

GRAHAM DY, DUFOUR G.R., ESTES M.K., Minimal infective dose of rotavirus. **Arch Virol**.;92(3-4):261-71, 1987.

GRANT T, GRIGORIEFF N., Measuring the optimal exposure for single particle cryo-EM using a 2.6 Å **reconstruction of rotavirus VP6**. *Elife*. . 29;4, 2015.

GREENBERG H.B., et al. Production and preliminary characterization of monoclonal antibodies directed at two surface proteins of rhesus rotavirus. **J Virol**. Aug;47(2):267-75, 1983.

GREIG S.L. et al. Structural determinants of rotavirus subgroup specificity mapped by cryo-electron microscopy. **J Mol Biol**. Feb 10;356(1):209-21, 2006.

GRIFFIN D.D. et al. Characterization of nontypeable rotavirus strains from the United States: identification of a new rotavirus reassortant (P2A[6] G12) and rare P3[9] strains related to bovine rotaviruses. **Virology**. Vol 294, 256-69, 2002.

- GROFT C.M., BURLEY S.K., Recognition of eIF4G by rotavirus NSP3 reveals a basis for mRNA circularization. **Mol Cell.** ;9:1273–1283, 2002.
- GUALTERO D.F. Amino acid domains 280-297 of VP6 and 531-554 of VP4 are implicated in heat shock cognate protein hsc70-mediated rotavirus infection. **Arch Virol.** ;152(12):2183-96, 2007.
- GUERRA. et al. Rotavirus Strain Surveillance for Three Years Following the Introduction of Rotavirus Vaccine into Belém, Brazil. **J Med Virology.** 87(8):1303-10, 2015.
- GUERRERO C.A. et al. Acosta O.N-Acetylcysteine treatment of rotavirus-associated diarrhea in children. **Pharmacotherapy.** Nov;34(11):e333-40, 2014.
- GUERRERO C.A., Acosta O. Inflammatory and oxidative stress in rotavirus infection. **World J Virol.** May 12;5(2):38-62, 2016.
- GURGEL R.Q. et al. Rotavírus genotypes circulating in Brazil before national rotavírus vaccination: a review. **J Clin Virol.** Sep;43(1):1-8. 2008.
- GUSMÃO R.H. et al. Rotavírus subgroups, G serotypes, and electrophoretotypes in cases of nosocomial infantile diarrhoea in Belém, Brazil. **J Trop Pediatr.** Vol 45, p81-6, 1999.
- HANLON P. et al. Epidemiology of rotavirus in a periurban Gambian community. **Ann Trop Paediatr.** Dec;7(4):238-43, 1987.
- HEMMING M., VESIKARI T., Detection of Rotateq®vaccine-derived double reassortant rotavírus in a 7-year-old child with acute gastroenteritis. **Pediatr.Infect. Dis. J,** 2013.
- HOSHINO Y., KAPIKIAN A.Z., Rotavírus vaccine development for the prevention of severe diarrhea in infants and young children. **Trends Microbiol.** Vol 2, p242–249, 1994.
- HOSSAIN M.U., HASHEM A., KEYA C.A., Salimullah M. Therapeutics Insight with Inclusive Immunopharmacology Explication of Human Rotavirus A for the Treatment of Diarrhea. **Front Pharmacol.** Jun 23;7:153, 2016.
- HU L. et al. Rotavírus non-structural proteins: Structure and Function. **Curr Opin Virol.** V 2(4): 380–388, 2012.
- HUANG H. et al. Interaction (s) of rotavírus non-structural protein 4 (NSP4) C-terminal peptides with model membranes. **Biochem J.** vol. 308; p723-33, 2004.
- IMAI M. Capped and conserved terminal structures in human rotavirus genome double-stranded RNA segments. **J virol.** Jul;47(1):125-36, 1983.

- ITO H. et al. Complete nucleotide sequence of a group A avian rotavirus genome and a comparison with its counterparts of mammalian rotaviruses. **Virus Res.** Vol 75; p123-38, 2001.
- ITURRIZA-GÓMARA M. et al. Reassortment in vivo: driving force for diversity of human rotavirus strains isolated in the United Kingdom between 1995 and 1999. **J Virol.** Vol 75, p3696-705, 2001.
- ITURRIZA-GÓMARA M. et al. Molecular characterization of VP6 genes of human rotavirus isolates: correlation of genogroups with subgroups and evidence of independent segregation. **J Virol.** Vol 76, p6596-601, 2002.
- ITURRIZA-GÓMARA M. et al. Gray J. Characterization of G10P[11] rotaviruses causing acute gastroenteritis in neonates and infants in Vellore, India. **J Clin Microbiol.** Jun;42(6):2541-7, 2004.
- ITURRIZA-GÓMARA M. Rotavirus genotypes co-circulating in Europe between 2006 and 2009 as determined by EuroRotaNet, a pan-European collaborative strain surveillance network. **Epidemiol Infect.** Jun;139(6):895-909, 2011.
- JAIN V. et al. Great diversity of group A rotavirus strains and high prevalence of mixed infections in India. **J Clin Microbiol.** Vol 39; p3524-9, 2001.
- JALILVAND S, MARASHI S.M., SHOJA Z., Rotavirus VP6 preparations as a non-replicating vaccine candidates. **J.VACCINE**, 2015.
- JAYARAM H, ESTES M.K., PRASAD B.V., Emerging themes in rotavirus cell entry, genome organization, transcription and replication. **Virus Res.** V101, p 67-81, 2004.
- JIANG B., GENTSCH J.R., GLASS R.I., The role of serum antibodies in the protection against rotavirus disease: an overview. **Clin Infect Dis.** V 34, p 1351-61, 2002.
- JIANG B., et al. Cytokines as Mediators for or Effectors against Rotavirus Disease in Children. **C D laboratory immunology.** Vol. 10, p. 995–1001, 2003.
- JOHNE R. et al. Sequence analysis of the VP6-encoding Genome segment of avian group F and G rotaviruses. **Virology.** Apr 10;412(2):384-91, 2011.
- JUSTINO M.C. et al. Effectiveness of the monovalent G1P [8] human rotavirus vaccine against hospitalisation for severe G2P [4] rotavirus gastroenteritis in Belém, Brazil. **Pediatr Infect Dis J.** V30, p 396–401, 2011.
- KAGA & NAKAGOMI O. Recurrent circulation of single nonstructural gene substitution reassortants among human rotaviruses with a short RNA pattern. **Arch Virol.** Vol 136, p63-71, 1994.

- KAPIKIAN A.Z. et al. Rotavirus: the major etiologic agent of severe infantile diarrhea may be controllable by a "Jennerian" approach to vaccination. **J Infect Dis.** May;153(5):815-22. Review, 1986.
- KAPIKIAN, A.Z. Viral gastroenteritis. **JAMA** 269: 627-630, 1993.
- KAPIKIAN A.Z, et al. Editors. **Fields Virology**. 4th. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; p.1787-833, 2001.
- KEIDAN I. et al. Rotavirus encephalopathy: evidence of central nervous system involvement during rotavirus infection. **Pediatr Infect Dis J.** V11, p773-5,1992.
- KELJO D. J. AND SMITH A. K. Characterization of binding of simian rotavirus SA-11 to cultured epithelial cells. **J Pediatric Gastroenterology Nutritional.** V 7, p.249- 256, 1988.
- KIM J.S. et al. Analysis of rotavirus genotypes in Korea during 2013: an increase in the G2P[4] genotype after the introduction of rotavirus vaccines. **Vaccine.** 12;32(48):6396-402, 2014.
- KIRKWOOD C, MASENDY CZ P.J, COULSON B.S. Characteristics and location of cross-reactive and serotype-specific neutralization sites on VP7 of human G type 9 rotaviruses. **Virology.** V196(1):79-88, 1993.
- KIRKWOOD et al. Rotavirus strain surveillance--an Australian perspective of strains causing disease in hospitalised children from 1997 to 2007. **Vaccine.** Nov 20;27 Suppl 5:F102-7, 2009.
- KOMOTO S, et al. Reassortment of Human and Animal Rotavirus Gene Segments in Emerging DS-1-Like G1P[8] Rotavirus Strains. **PLoS One.** Feb 4;11(2), 2016.
- KOO H.L., et al. Noroviruses: the most common pediatric viral enteric pathogen at a large university hospital after introduction of rotavirus vaccination. **J. Pediatric Infect.Dis.** p57-60. 2013.
- KOSHIMURA Y, NAKAGOMI T, NAKAGOMI O. The relative frequencies of G serotypes of rotaviruses recovered from hospitalized children with diarrhea: A 10-year survey (1987-1996) in Japan with a review of globally collected data. **Microbiol Immunol.** 44(6):499-510, 2000.
- KOVACS-NOLAN J, YOO D, MINE Y. Fine mapping of sequential neutralization epitopes on the subunit protein VP8 of human rotavirus. **Biochem J.** V15, 269-75. 2003.

- LANATA C.F. et al. Protection of Peruvian children against rotavirus diarrhea of specific serotypes by one, two, or three doses of the RIT 4237 attenuated bovine rotavirus vaccine. **J Infect Dis.** Mar;159(3):452-9, 1989.
- LAZDINS I, et al. Rotavirus antigenicity is affected by the genetic context and glycosylation of VP7. **Virology.** May 10;209(1):80-9, 1995.
- LAWTON J.A. et al. Three-dimensional structural analysis of recombinant rotavirus-like particles with intact and amino-terminal-deleted VP2: implications for the architecture of the VP2 capsid layer. **J Virol.** 71(10):7353-60, 1997.
- LEITE J.P.G. et al. Group A rotavirus genotypes and the ongoing Brazilian experience - A Review. **Mem Inst Oswaldo Cruz,** Vol. 103, p745-753, 2008.
- LESHEM, E. et al. Rotavirus vaccines and health care utilization for diarrhea in the United States (2007-2011). **Pediatrics,** pii:peds. 2013-3849, 2014.
- LIN C.L. et al. Disease Caused by Rotavirus Infection. **The Open Virology Journal.** 8, 14-19. 2014
- LINHARES A.C. [Duovirus (Rotavirus) in Belém, State of Para, Brazil (preliminary report)]. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo.** Jul-Aug;19(4):278-9, 1977.
- LINHARES A.C., BRESEE J.S. Rotavirus vaccines and vaccination in Latin America. **Rev Panam Salud Publica,** V8, p 305-3, 2000.
- LINHARES A.C. et al. Nutritional status in relation to the efficacy of the rhesus-human reassortant, tetravalent rotavirus vaccine (RRV-TV) in infants from Belém, Pará state, Brazil. **Rev Inst Med Trop,** vol 44, p13-6, 2002.
- LINHARES e VELÁZQUEZ. **Emerging Infectious Diseases** ,Vol. 14, No. 5, May 2008.
- LINHARES A.C. et al. Effectiveness of the human rotavirus vaccine against hospitalization for severe rotavirus gastroenteritis in Belém, Brazil. **ESPID.** 2010.
- LINHARES A. C. et al., Burden and typing of rotavirus group A in Latin America and the Caribbean: systematic review and meta analysis. **Rev. Med. Virol.,** 2011.
- LIU J. et al. Multiplex reverse transcription PCR Luminex assay for detection and quantitation of viral agents of gastroenteritis. **J Clin Virol.** v50(4):308-13. 2011.
- LIU L, et al. Global, regional, and national causes of child mortality in 2000-13, with projections to inform post-2015 priorities: an updated systematic analysis. **Lancet.** V 385: 430-440. 2015.
- LUCHS A. et al. Rotavirus in adults, Brazil, 2004-2011: G2P[4] dominance and potential impact on vaccination. **Braz J Infect Dis.** 18(1):53-9. 2014.

- LUCHS A. Et al. Rotavirus Genotypes Circulating In Brazil, 2007-2012: Implications For The Vaccine Program. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**. 57(4): 305–313. 2015.
- LUCHS A. et al. Detection of the emerging rotavirus G12P[8] genotype at high frequency in Brazil in 2014: Successive replacement of predominant strains after vaccine introduction. **Acta Trop**. 156:87-94. 2016.
- LUNDGREN O, SVENSSON L. Pathogenesis of rotavirus diarrhea. **Microbes Infect**. 3(13):1145-56. 2001.
- LUZ C.R. et al. Rotavirus serotypes and electropherotypes identified among hospitalised children in São Luís, Maranhão, Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**. 47(5):287-93. 2005.
- LYNCH M. et al. Rotavirus and central nervous system symptoms: cause or contaminant? Case reports and review. **Clin Infect Dis**. V33, p 932-8, 2001.
- MCNEAL, M. M., M. N. RAE, AND R. L. WARD. Evidence that resolution of rotavirus infection in mice is due to both CD4 and CD8 cell-dependent activities. **J. Virol**. V71, p8735–8742, 1997.
- MADHI, S.A., et al. Effect of human rotavirus vaccine on severe diarrhea in African infants. **N. Engl. J. Med**. V 362, p289–298, 2010.
- MODARESS S. Human rotavirus genotypes detection among hospitalized children, a study in Tehran, Iran. **Arch Iran Med**. 14(1):39-45. 2011.
- MADORE H.P.. Field trial of rhesus **rotavirus** or human-rhesus **rotavirus** reassortant vaccine of VP7 serotype 3 or 1 specificity in infants. The Elmwood, Panorama, and Westfall Pediatric Groups. **J Infect Dis**. 166(2):235-43. 1992.
- MANEEKARN N AND KHAMRIN P. Rotavirus associated gastroenteritis in Thailand. **VirusDis**. 25(2):201–207. 2014.
- MARTELLA V. et al. Sequence analysis of the VP7 and VP4 genes identifies a novel VP7 gene allele of porcine rotaviruses, sharing a common evolutionary origin with human G2 rotaviruses. **Virology**. V 337, p 111-23, 2005.
- MARTINEZ-LAZO J, et al. Phylogeny of G9 rotavirus genotype: a possible explanation of its origin and evolution. **J Clin Virol**. 2008.
- MASCARENHAS JD, et al. Molecular characterization of VP4 and NSP4 genes from rotavirus strains infecting neonates and young children in Belém, Brazil. **Virus Res**. Vol 126, p149-58, 2007.



- MASCARENHAS JD, et al. Identification of two sublineages of genotype G2 rotavirus among diarrheic children in Parauapebas, Southern Pará State, Brazil. **J Med Virol.** Vol 82, p712-9, 2010.
- MATHIEU M. et al. Atomic structure of the major capsid protein of rotavirus: implications for the architecture of the virion. **EMBO J.** 20(7):1485-97. 2001.
- MATSON, D. O. et al. Characterization of serum antibody responses to natural rotavirus infections in children by VP7-specific epitope-blocking assays. **J. Clin. Microbiol.** V 30, p1056–1061, 1992.
- MATTHIJNSSENS J, et al. Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. **Arch Virol.** 153(8):1621-9, 2008.
- MATTHIJNSSENS J. et al. Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). **Arch Virol.** V156: 1397–1413. 2011.
- MATTHIJNSSENS J and VAN RANST M. Genotype constellation and evolution of group A rotaviruses infecting humans. **Curr Opin Virol.** 2(4):426-33. 2012.
- MATTHIJNSSENS J. et al. Group A rotavirus universal mass vaccination: how and to what extent will selective pressure influence prevalence of rotavirus genotypes? **Expert Rev Vaccines.** v11(11), p1347-54. 2012.
- MATTHIJNSSENS, J., et al. The RotaBel studygroup, Higher proportion of G2P[4] rotaviruses in vaccinated hospitalised cases compared to unvaccinated hospitalised cases, despite high vaccine effectiveness against heterotypic G2P[4] rotaviruses. **Clin. Microbiol. Infect.** 2014.
- MÉNDEZ E, LÓPEZ S, CUADRAS MA, ROMERO P, ARIAS CF. Entry of rotaviruses is a multistep process. **Virology.** V25;263(2):450-9. 1999.
- MERTENS P. The dsRNA viruses. **Virus Res.** V 101, p3-13, 2004.
- MIHALOV-KOVÁCS E, et al. Candidate new rotavirus species in sheltered dogs, Hungary. **Emerg Infect Dis.** 21(4):660-3. 2015.
- MOLINARI B.L. et al. Species H rotavirus detected in piglets with diarrhea, Brazil, 2012. **Emerg Infect Dis.** 20(6):1019-22. 2014.
- MORILLO SG, et al., Characterization of rotavirus strains from day care centers: pre- and post-rotavirus vaccine era. **J Pediatr (Rio J).** 86:155–158. 2010.
- MOON HW. Comparative histopathology of intestinal infections. **Adv Exp Med Biol.** V412, p1-19, 1997.

- MONTENEGRO FM, et al. Reduction in Rotavirus Disease and Sustained Predominance of G2P[4] Rotavirus Strain following Introduction of Rotavirus Vaccine in Recife, Brazil. **J Trop Pediatr**. 2015.
- MORI Y. et al.. Diarrhea-inducing activity of avian rotavirus NSP4 glycoproteins, which differ greatly from mammalian rotavirus NSP4 glycoproteins in deduced amino acid sequence in suckling mice. **J Virol**, V76, p 5829-5834, 2002.
- MORILLO SG, LUCHS A, CILLI A, COSTA FF, CARMONA RC, TIMENETSKY MC. Characterization of rotavirus strains from day care centers: pre- and post-rotavirus vaccine era. **J Pediatr**. V86, p155-8, 2010.
- MUKHERJEE A. et al. Full genomic analysis of a human group A rotavirus G9P[6] strain from Eastern India provides evidence for porcine-to-human interspecies transmission. **Arch Virol**. 154(5):733-46. 2009.
- MUNFORD V, et al. Rotavirus gastroenteritis in children in 4 regions in Brazil: a hospital-based surveillance study. **J Infect Dis**. Vol 200, pS106-13, 2009.
- MURPHY B.R. et al. Reappraisal of the association of intussusception with the licensed live rotavirus vaccine challenges initial conclusions. **J Infect Dis**. 187(8):1301-8. 2003.
- MUSALEM, C.; ESPEJO, R. T. Release of progeny virus from cells infected with simian rotavirus SA11. **Journal of General Virology**. V.66, p.2715-2724, 1985.
- NAGASHIMA S. et al. Whole genomic characterization of a human rotavirus strain B219 belonging to a novel group of the genus Rotavirus. **J Med Virol**. 80(11):2023-33. 2008.
- NAKAGOMI O, NAKAGOMI T. Molecular evidence for naturally occurring single VP7 gene substitution reassortant between human rotaviruses belonging to two different genogroups. **Arch Virol**. Vol 119, p67-81, 1991.
- NAKAGOMI T. et al. Apparent extinction of non-G2 rotavirus strains from circulation in Recife, Brazil, after the introduction of rotavirus vaccine. **Arch Virol**. 153:591-593, 2008.
- NEWMAN, R. D. et al. Perinatal riskfactors for infant hospitalization with viral gastroenteritis. **Pediatrics**. V103, p E3, 1999.
- NIRWATI H. et al. Detection of group A rotavirus strains circulating among children with acute diarrhea in Indonesia. **Springerplus**. 29;5:97. 2016.
- O'BRIEN JA, TAYLOR JA, BELLAMY AR. Probing the structure of rotavirus NSP4: a short sequence at the extreme C terminus mediates binding to the inner capsid particle. **J Virol**. 74(11):5388-94. 2000.

- OFFIT PA. Host factors associated with protection against rotavirus disease: the skies are clearing. **J. Infect Dis.** V 174, p 559-64, 1996.
- OKADERA K, Abe M, Ito N, Mitake H, Okada K, Nakagawa K, Une Y, Tsunemitsu H, Sugiyama M. Isolation and Characterization of a Novel Type of Rotavirus Species A in Sugar Gliders (*Petaurus Breviceps*). **J Gen Virol.** 2016.
- OLIVEIRA A.S.L, et al. Rotavirus serotype distribution in northern Brazil trends over a 27 year period pre and post national vaccine introduction. **Trials in Vaccinol.** V 1:4–9, 2012.
- OLIVEIRA LH, et al. Rotavirus vaccine effectiveness in Latin American and Caribbean countries: A systematic review and meta-analysis. **Vaccine.** V 7;33 p 248-54, 2015.
- OMS. Estimated rotavirus deaths for children under 5 years of age: 2004. **Geneva:WHO,2005.**[www.who.int/immunization\\_monitoring/burden/rotavirus\\_estimates/en/index.html](http://www.who.int/immunization_monitoring/burden/rotavirus_estimates/en/index.html). 2005.
- O'RYAN, M. L. et al. Anti-rotavirus G type-specific and isotype-specific antibodies in children with natural rotavirus infections. **J. Infect. Dis.** V169, p504–511, 1994.
- O'RYAN M, LINHARES AC. Update on Rotarix: an oral human rotavirus vaccine. **Expert Rev Vaccines.** Vol 8, p1627-41, 2009.
- PADILLA-NORIEGA L. et al. Humoral immune responses to VP4 and its cleavage products VP5\* and VP8\* in infants vaccinated with rhesus rotavirus. **J Clin Microbiol.** 30(6):1392-7. 1992.
- PAGE NA, STEELE AD. Antigenic and genetic characterization of serotype G2 human rotavirus strains from the African continent. **J Clin Microbiol.** Vol 42, p595-600, 2004.
- PALOMBO EA, et al. Multiple-gene rotavirus reassortants responsible for an outbreak of gastroenteritis in central and northern Australia. **J Gen Virol.** V77, p1223-7, 1996.
- PANT N, MARCOTTE H, Brüßow H, Svensson L, Hammarström L. Effective prophylaxis against rotavirus diarrhea using a combination of *Lactobacillus rhamnosus* GG and antibodies. **BMC Microbiol.** 27;7:86.2007.
- PARASHAR, U.D. et al. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. **Emerg Infect Dis.** V9, p565-72, 2003.
- PATEL, M.M., PARASHAR, U.D. Assessing the effectiveness and public health impact of rotavirus vaccines after introduction in immunization programs. **J.Infect. Dis.** V 200, p291–299, 2009.
- PATTON, J.T., SPENCER, E. Genome replication and packaging of segmented doublestranded RNA viruses. **Virology.** V277, p217-25, 2000. PATTON J.T. et al.

Rotavirus genome replication and morphogenesis: role of the viroplasm. **Curr Top Microbiol Immunol.** 309:169–187. 2006

PAYNE, D.C, et al. Effectiveness of pentavalent and monovalent rotavirus vaccines in concurrent use among US children <5 years of age, 2009–2011. **Clin. Infect. Dis.** V 57, p13–20, 2013.

PELÁEZ-CARVAJAL, D., et al. Characterization of rotavirus genotypes before and after the introduction of a monovalent rotavirus vaccine in Colombia. **J. Med. Virol.** V 86, p1083–1086, 2014.

PÉREZ-SCHAEL I. et al. Intussusception-associated hospitalization among Venezuelan infants during 1998 through 2001: anticipating rotavirus vaccines. **Pediatr Infect Dis J.** V22, p234-9, 2003.

PESAVENTO J.B. et al. Structures of rotavirus reassortants demonstrate correlation of altered conformation of the VP4 spike and expression of unexpected VP4-associated phenotypes. **J Virol.** 77(5), p3291-6. 2003.

PORUCHYNSKY MS, ATKINSON PH. Rotavirus protein rearrangements in purified membrane-enveloped intermediate particles. **J Virol.** V65, p4720-7, 1991.

QUINTANAR-SOLARES, M., et al.. Impact of rotavirus vaccination on diarrhea-related hospitalizations among children <5 years of age in Mexico. **Pediatr. Infect. Dis. J.** V 30, p11–15, 2011.

RAHMAN M. et al. Genetic characterization of a novel, naturally occurring recombinant human G6P[6] rotavirus. **J Clin Microbiol.** V41, p2088-95, 2003.

RAMIG RF AND WARD RL. Genomic segment reassortment in rotaviruses and other reoviridae. *Adv Virus Res.* V39, n163-207, 1991.

RHA, B., et al. Effectiveness and impact of rotavirus vaccines in the United States – 2006–2012. **Expert Rev. Vaccines.** V13, p365–376, 2014.

RICHARDSON V. et al. Effect of rotavirus vaccination on death from childhood diarrhea in Mexico. **N Engl J Med.** vol 362, p299-305, 2010.

RHEINGANS RD, et al. Economic costs of rotavirus gastroenteritis and cost-effectiveness of vaccination in developing countries. **J Infect Dis.** Vol 200 p16-27, 2009.

RODRIGUEZ W. J. et al Sequential enteric illnesses associated with different rotavirus serotypes. **Lancet.** 2(8079):37. 1978 .

ROLLO, E. E. et al. The epithelial cell response to rotavirus infection. **J. Immunol.** V 163, p 4442–4452, 1999.

- ROSE J, et al. Public health impact and cost effectiveness of mass vaccination with live attenuated human rotavirus vaccine (RIX4414) in India: model based analysis. **BMJ**. Vol 25; p339, 2009.
- ROTAVÍRUS CLASSIFICATION WORKING GROUP, 6th meeting, Valencia, October 2013. Rubio, R.M., Mora, S.I., Romero, P., Arias, C.F., López, S., 2013. Rotavirus prevents the expression of host responses by blocking the nucleocytoplasmic transport of polyadenylated mRNAs. **J. Virol**. V87, 6336–6345, 2013.
- ROTAVIRUS CLASSIFICATION WORKING GROUP (RCWG). Newly assigned genotypes. (<https://rega.kuleuven.be/cev/viralmetagenomics/virus-classification/rcwg>). 2015.
- RUIZ M.C. et al. Cell lines susceptible to infection are permeabilized by cleaved and solubilized outer layer proteins of rotavirus. **J Gen Virol**. V78, p2883-93, 1997.
- RUIZ, M. C; COHEN, J.; MICHELANGELI, F. Role of Ca<sup>2+</sup> in the replication and pathogenesis of rotavirus and other viral infectious. **Cell calcium**. V.3, p.137-149, 2000.
- RUIZ-PALACIOS, G. M., I. et al. Safety and efficacy of an attenuated vaccine against severe rotavirus gastroenteritis. **N. Engl. J. Med**. V354, p11–22, 2006.
- SANTOS, N., AND Y. HOSHINO. Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. **Rev. Med. Virol**. V15, p29–56, 2005.
- SANTOS N. et al. Surveillance of rotavirus strains in Rio de Janeiro, Brazil, from 1997 to 1999. **J Clin Microbiol**. V41, p399-402, 2003.
- SANTOS N. et al. Development of a microtiter plate hybridization-based PCR-enzyme-linked immunosorbent assay for identification of clinically relevant human group A rotavirus G and P genotypes. **J Clin Microbiol**. 46(2):462-9. 2008.
- SANTOS VS et al. Effectiveness of rotavirus vaccines against rotavirus infection and hospitalization in Latin America: systematic review and meta-analysis. **Infect Dis Poverty**. 12;5(1):83. 2016.
- SANTOSHAM M. et al. A field study of the safety and efficacy of two candidate rotavirus vaccines in a Native American population. **J Infect Dis**. 163(3):483-7. 1991.
- SANTOSHAM M. et al. Efficacy and safety of high-dose rhesus-human reassortant rotavirus vaccine in Native American populations. **J Pediatr**. 131(4):632-8. 1997.
- SANTOSHAM M. Rotavirus vaccine a powerful tool to combat deaths from diarrhea. **N Engl J Med**. V362, p358-60, 2010.

- SASTRI NP, et al. Structural plasticity of the coiled-coil domain of rotavírus NSP4. **J Virol.** 88(23):13602-12. 2014.
- SOARES L da S. et al. Identification of lineage III of G12 rotavirus strains in diarrheic children in the Northern Region of Brazil between 2008 and 2010. **Arch Virol.** 157(1):135-9. 2012.
- SOÁREZ PC. et al. Cost-effectiveness analysis of routine rotavírus vaccination in Brazil. **Rev Panam Salud Publica.** Vol 23, p221-30, 2008.
- SHARMA, *et al.* Genomic characterization of non typeable rotaviruses and detection of a rare G8 strain in Delhi, India. **J Clin Microbiol.** 2009.
- SVENSSON L. et al. Immune response to rotavirus polypeptides after vaccination with heterologous rotavirus vaccines (RIT 4237, RRV-1). **J Gen Virol.** V68, p1993–1999, 1987.
- TANAKA OY, Melo C. Avaliação de Programas de Saúde de Adolescentes: Um Modo de Fazer. 1ª Ed. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo; 2006.
- TATE JE et al. Global impact of rotavirus vaccines. **Expert Rev Vaccines.** 9(4):395-407. 2010.
- TATE JE. Et al. Uptake, impact, and effectiveness of rotavirus vaccination in the United States: review of the first 3 years of postlicensure data. **Pediatr Infect Dis J.** 30(1 Suppl):S56-60. 2011.
- TATE JE et al. Remaining issues and challenges for rotavírus vaccine in preventing global childhood diarrheal morbidity and mortality. **Expert Rev Vaccines.** 11(2):211-20. 2012.
- TÉLLEZ M.A. et al. In vitro antiviral activity against rotavirus and astrovirus infection exerted by substances obtained from *Achyrocline bogotensis* (Kunth) DC. (Compositae). **BMC Complement Altern Med.** 15(1):428. 2015.
- TIMENETSKY M do C, SANTOS N, GOUVEA V. Survey of rotavirus G and P types associated with human gastroenteritis in São Paulo, Brazil, from 1986 to 1992. **J Clin Microbiol.** v32:2622–2624. 1994.
- TORRES-VEGA MA. et al. The C-terminal domain of rotavirus NSP5 is essential for its multimerization, hyperphosphorylation and interaction with NSP6. **J Gen Virol.** 81:821–830. 2000.
- TREGNAGHI, M.W, et al. Human rotavírus vaccine is highly efficacious when coadministered with routine expanded program of immunization vaccines including oral poliovirus vaccine in Latin America. **Pediatr. Infect. Dis.J.** V 30, p103–108, 2011.

- TROJNAR E. et al. Identification of an avian group A rotavirus containing a novel VP4 gene with a close relationship to those of mammalian rotaviruses. **J Gen Virol.** 94(Pt 1):136-42. 2013.
- URSU K et al. Molecular analysis of the VP7 gene of pheasant rotaviruses identifies a new genotype, designated G23. **Arch Virol.** Vol 154, p 1365–9, 2009.
- VAN DOORN L.J. et al. Detection and genotyping of human rotavirus VP4 and VP7 genes by reverse transcriptase PCR and reverse hybridization. **J Clin Microbiol.** Sep;47(9):2704-12. 2009.
- VARGHESE V. et al. Characterization of VP1, VP2 and VP3 gene segments of a human rotavirus closely related to porcine strains. **Virus Genes.** 32(3):241-7. 2006.
- VELÁZQUEZ, F.R., et al. Rotavirus infections in infants as protection against subsequent infections. *N. Engl. J. Med.* Vol 335, p 1022–1028, 1996.
- VENDE P, TARAPOREWALA ZF, PATTON JT. RNA-binding activity of the rotavirus phosphoprotein NSP5 includes affinity for double-stranded RNA. **J Virol.** v76:5291–5299. 2002.
- VESIKARI T. et al. Immunogenicity and safety of live oral attenuated bovine rotavirus vaccine strain RIT 4237 in adults and young children. **Lancet.** ;2(8354):807-11. 1983.
- VESIKARI T. et al. Dose-response study of RIT 4237 oral rotavirus vaccine in breast-fed and formula-fed infants. **Pediatr Infect Dis.** 4(6):622-5. 1985.
- VESIKARI T. et al. Rhesus Rotavirus candidate vaccine. Clinical trial in children vaccinated between 2 and 5 months of age. **Am J Dis Child.** 144(3):285-9. 1990.
- VESIKARI T, et al. Efficacy of a pentavalent rotavirus vaccine in reducing rotavirus-associated health care utilization across three regions (11 countries). **J Infect Dis.** vol 2, p29-35, 2007.
- VESIKARI, T. et al. Efficacy of the pentavalent rotavirus vaccine, RotaTaq®, in Finnish infants up to 3 years of age: the Finnish Extension Study. **Eur. J. Pediatr.** V169, p1379–1386, 2010.
- WARD RL. et al. Formation and selection of intergenogroup reassortants during cell culture adaptation of rotaviruses from dually infected subjects. **J Virol.** Vol 65, p2699-701, 1991.
- WENTZ MJ, PATTON JT, RAMIG RF. The 3'-terminal consensus sequence of rotavirus mRNA is the minimal promoter of negative-strand RNA synthesis. **J Virol.** V70, p7833-41, 1996.

WU F T, et al. Molecular epidemiology of human G2P[4] rotaviruses in Taiwan, 2004–2011. **Infect. Genet. Evol.** 2014.

YOSHIDA A. et al. Rotavirus encephalitis: detection of the virus genomic RNA in the cerebrospinal fluid of a child. **Pediatr Infect Dis J.** V14, p914-6, 1995.

ZAMAN, K. Efficacy of pentavalent rotavirus vaccine against severe rotavirus gastroenteritis in infants in developing countries in Asia: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. **Lancet** V: 376 (9741), p615–623, 2010.

ZARATE S. et al. The VP5 domain of VP4 can mediate attachment of rotaviruses to cells. **J Virol.** V74, p593- 599, 2000.

ZÁRATE S. et al. VP7 mediates the interaction of rotaviruses with integrin  $\alpha$ v $\beta$ 3 through a novel integrin-binding site. **J Virol.** V78, p10839-47, 2004.

ZAO CL et al. Sequence analysis of VP1 and VP7 genes suggests occurrence of a reassortant of G2 rotavirus responsible for an epidemic of gastroenteritis. **J Gen Virol.** Vol 80, p1407-15, 1999.

ZHENG B. J. et al. Rotavirus infection of the oropharynx and respiratory tract in young children. **J Med Virol.** 34(1):29-37. 1991.



# APÊNDICES



```

          90      100      110      120      130      140      150      160
Hu/DS-1/1976/USA_AB118025 WLLISSNTFGVVVYESTNNIDFWTAVIAVEPHVVSQTNRCQYILFGENKQFNVENNNDKWKKFFEMFKGSSQGNFNRRLTSS
RV117236 D.....S.....I.....I.....SD.....N
HST001 D.....S.....N I...V.....I.S.....SD.....N
HSP369 D.....S.....N...V.....I.S.....SD.....N
HST181 D.....S.....N...V.....I.S.....SD.....N
HST030 D.....S.....N...V.....I.S.....SD.....N
HSP187 D.....S.....N...V.....I.S.....SD.....N
RV97707 D.....S.....V.....I.S.....SD.....N
RV115036 D.....S.....V.....I.S.....SD.....N
RV111823 D.....S.....V.....I.S.....SD.....N
1A3558 D.....S.....V.....I.S.....SD.....N
RV100104 D.....S.....V.....I.S.....SD.....N
1A0174 D.....S.....I...V.....I.S.....SD.....N
RV97064 D.....S.....V.....I.S.....SD.....N
1A0808 D.....S.....V.....I.S.....SD.....N
2A3463 D.....S.....V.....I.S.....SD.....N
RV96876 D.....S.....V.....I.S.....SD.....N
RV044 D.....S.....V.....I.S.....SD.....N
1A0174 D.....S.....V.....I.S.....G.SD.....N
1A0028 D.....S.....V.....I.S.....G.SD.....N
Hu/MMC6/G2P4/20005/Bangladesh D.....S.....V.....S.....SD.....N
RV115156 D.....S.....S.....SD.....N
RV114210 D.....S.....S.....SD.....N
RV97717 D.....S.....P...V...S.....SD.....D
RV105657 D.....S.....P...V...S.....SD.....D
RV105665 D.....S.....P...V...S.....SD.....D
RV117236 D.....S.....P...V...S.....SD.....D
RV99932 D L...S.....P...V...S.....SD.....D
RV109743 D.....S.....P...V...S.....SD.....D
RV115018 D.....S.....P...V...S.....SD.....D
RV111830 D.....S.....S.....SD.....N
NSC-314 D.....S.....I.....T.....R.....SD.....N
NSC-206 D.....S.....S.....R.....SD.....N
NSC-105 X.....S.....S.....R.....SD.....N

```

A3: Alinhamento das seqüências de aminoácidos da proteína VP1 das amostras da região Norte do Brasil. Os aminoácidos estão indicados pelo código de abreviação de uma letra. Os pontos simbolizam a identidade de aminoácido com o protótipo DS-1.

```

          170      180      190      200      210      220      230      240
Hu/DS-1/1976/USA_AB118025 NRLVGMILKYGGRVWTFHGETPRAITDSSNTADLNNI SI II HSEFYIIPRSQESKCEYDNNGLPPIQNTRNWPLSLSSR
RV111853 .....S.....SD.....N
RV24751 ..G.....S.....V.....N
HST001 ..G.....S.....V.....N
HSP187 ..G.....S.....V.....N
HST030 ..G.....S.....V.....N
HST181 ..G.....S.....V.....N
RV97707 .....S.....SD.....N
RV96895 .....S.....SD.....N
RV114215 .....S.....SD.....N
2A2300 .....S.....SD.....N
100104 .....S.....SD.....N
RV96877 .....S.....SD.....N
1A0808 ..I..H.....T.....N
RV105658 .....S.....SD.....N
RV105636 ..I.....S.....SD.....N
2A3463 ..I.....S.....SD.....N
RV97064 .....S.....SD.....N
RV115156 .....S.....SD.....N
RV044 .....S.....SD.....N
1A3158 .....S.....SD.....N
RV99932 .....S.....T.....SD.....N
RV114210 .....S.....T.....SD.....N
1A0174 .....S.....SD.....N
RV96876 .....S.....SD.....N
RV111830 .....S.....SD.....N
RV117236 .....S.....SD.....N
RV97717 .....S.....SD.....N
RV113425 .....S.....SD.....N
RV115018 .....S.....SD.....N
1A0028 .....S.....SD.....N
NSC-314 .....S.....T.....SD.....N
NSC-082 .....S.....T.....SD.....N
NSC-206 .....S.....T.....SD.....N

```

A4: Alinhamento das seqüências de aminoácidos da proteína VP2 das amostras da região Norte do Brasil. Os aminoácidos estão indicados pelo código de abreviação de uma letra. Os pontos simbolizam a identidade de aminoácido com o protótipo DS-1.

	60	90	100	110	120	130	140
Hu/DS-1	TSGEFPLTSTLCLYYPAEAKNEISDDEWENTLSQLFLTKGWPIGSVYFKDYNDINTFSVNPQLYCDYINVV						
HST-030	T	T		T		M	
HST-001	T	T		T		M	
HST-181	T	T		T		M	
HST-369	T	T		T		M	
HSP-187	T	T		T		M	
RV96895	S	T	N	T		M	
RV97717	S	T	N	T		M	
RV115156	S	T	N	T		M	
RV97707	S	T	N	T		M	
1A3158	S	T	N	T		M	
RV24751	S	T	N	T		M	
1A0808	S	T	N	T		M	
NSC-206	S	T	N	T		M	
RV115018	S	T	N	T		M	
RV044	S	T	N	T		M	
RV96877	S	T	N	T		M	
RV115036	S	T	N	T		M	
1A1852	S	T	N	T		M	
2A3463	S	T	N	T		M	
RV97064	S	T	N	T		M	
RV983121	S	T	N	T		M	
2A2300	S	T	N	T		M	
RV111830	S	T	N	T		M	
RV100104	S	T	N	T		M	
1A0028	S	T	N	T		M	
1A0174	S	T	N	T		M	
RV114215	S	T	N	T		M	
RV96876	S	T	N	T		M	
RV117236	S	T	N	T		M	
RV113425	S	T	N	T		M	
RV109743	S	T	N			M	
RV111823	S	T	N			M	
RV105658	S	T	N			M	
RV114210	S	T	N			M	
RV99932	S	T	N			M	
RV105665	S	T	N			M	
RV105657	S	T	N			M	
NSC-105	S					M	
NSC-314	S					M	
NSC-082	S					M	

A5: Alinhamento das seqüências de aminoácidos da proteína VP3 das amostras da região Norte do Brasil. Os aminoácidos estão indicados pelo código de abreviação de uma letra. Os pontos simbolizam a identidade de aminoácido com o protótipo DS-1.

```

          90      100      110      120      130      140      150      160
Hu/DS-1/1976/USA_AB118025  WLLISSNTNGVVESTNNHDFWTAIVAVEPHVSQTNRQYLPGENKQFVVEVNSDKKQKFFEMKGGSSQGNFVSNRRRLTSS
2A2300      |           S             I             S
HST001           S             N             I             S
HSP369           S             N             I             S
HST181           S             N             I             S
HST030           S             N             I             S
HSP187           S             N             I             S
RV97707          S             I             S
RV115036         S             I             S
RV111823         S             I             S
1A3558           S             I             S
RV100104         S             I             S
1A0174           S             I             S
RV97064          S             I             S
1A0808           S             I             S
2A3463           S             I             S
RV96876          S             I             S
RV044            S             I             S
1A0174           S             V             I             S
1A0028           S             V             I             S
2A2300           S             V             I             S
RV115156         D             S             S
RV114210         D             S             S
RV97717          D             S             P             V             S
RV105657         D             S             P             V             S
RV105665         D             S             P             V             S
RV117236         D             S             P             V             S
RV99932          D             S             P             V             S
RV109743         D             S             P             V             S
RV115018         D             S             P             V             S
RV111830         D             S             P             V             S
NSC-314          D             S             I             T             S
NSC-206          D             S             S
NSC-105          D             S

```

A6: Alinhamento das sequências de aminoácidos da proteína VP6 das amostras da região Norte do Brasil. Os aminoácidos estão indicados pelo código de abreviação de uma letra. Os pontos simbolizam a identidade de aminoácido com o protótipo DS-1.

	80	90	100	110	120	130	140
Hu/DS-1	TSCEPFLTSTLCLYYPAEAKNEISDDEMENTLSQLFLTKGWPIGSVYFKDYNDINTFSVNPQLYCDYNVV						
HST-030	.....TL.....T.....I.....T.....M.....						
HST-001	.....TL.....T.....T.....T.....M.....						
HST-181	.....TL.....T.....T.....T.....M.....						
HST-369	.....TL.....T.....T.....T.....M.....						
HSP-187	.....TL.....T.....T.....T.....M.....						
RV96895	.....S.....T.....N.....T.....T.....M.....						
RV97717	.....S.....T.....N.....T.....T.....M.....						
RV115156	.....S.....T.....N.....T.....T.....M.....						
RV97707	.....S.....T.....N.....T.....T.....M.....						
1A3158	.....S.....T.....N.....T.....T.....M.....						
RV24751	.....S.....T.....N.....T.....T.....M.....						
1A0808	.....R.S.....T.....N.....T.....T.....M.....						
NSC-206	.....S.....T.....N.....T.....T.....M.....						
RV115018	.....S.....T.....N.....T.....T.....M.....						
RV044	.....S.....T.....N.....T.....T.....M.....						
RV96877	.....S.....T.....N.....T.....T.....M.....						
RV115036	.....S.....T.....N.....T.....T.....M.....						
1A1852	.....S.....T.....N.....T.....T.....M.....						
2A3463	.....S.....T.....N.....T.....T.....M.....						
RV97064	.....S.....T.....N.....T.....T.....M.....						
RV983121	.....S.....T.....N.....T.....T.....M.....						
2A2300	.....S.....T.....N.....T.....T.....M.....						
RV111830	.....S.....T.....N.....T.....T.....M.....						
RV100104	.....S.....T.....N.....T.....T.....M.....						
1A0028	.....S.S.....T.....N.....T.....T.....M.....						
1A0174	.....S.A.....T.....N.....T.....T.....M.....						
RV114215	.....S.A.....T.....N.....T.....T.....M.....						
RV96876	.....S.A.....T.....N.....T.....T.....M.....						
RV117236	.....S.A.....T.....N.....T.....T.....M.....						
RV113425	.....S.A.....T.....N.....T.....T.....M.....						
RV109743	.....S.A.....T.....N.....T.....T.....M.....						
RV111823	.....S.A.....T.....N.....T.....T.....M.....						
RV105658	.....S.A.....T.....N.....T.....T.....M.....						
RV114210	.....S.A.....T.....N.....T.....T.....M.....						
RV99932	.....S.A.....T.....N.....T.....T.....M.....						
RV105665	.....S.A.....T.....N.....T.....T.....M.....						
RV105657	.....S.A.....T.....N.....T.....T.....M.....						
NSC-105	.....N.S.....T.....T.....T.....M.....						
NSC-314	.....N.S.....T.....T.....T.....M.....						
NSC-082	.....N.S.....T.....T.....T.....M.....						

A7: Alinhamento das seqüências de aminoácidos da proteína NSP1 das amostras da região Norte do Brasil. Os aminoácidos estão indicados pelo código de abreviação de uma letra. Os pontos simbolizam a identidade de aminoácido com o protótipo DS-1.









