

Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Parasitária

MARCELLE FIGUEIRA MARQUES DA SILVA

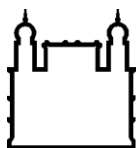
ROTAVÍRUS A GENÓTIPOS G5 E G1 ASSOCIADOS AO GENÓTIPO P[8]  
CIRCULANDO NO BRASIL DE 1986 A 2013: VARIABILIDADE  
GENÉTICA PRÉ E PÓS-VACINAÇÃO

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de Concentração: Genética e Bioquímica.

Orientador: Dr. José Paulo Gagliardi Leite

RIO DE JANEIRO

2014



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

Pós-Graduação em Biologia Parasitária

**MARCELLE FIGUEIRA MARQUES DA SILVA**

**ROTAVÍRUS A GENÓTIPOS G5 E G1 ASSOCIADOS AO GENÓTIPO P[8]  
CIRCULANDO NO BRASIL DE 1986 A 2013: VARIABILIDADE  
GENÉTICA PRÉ E PÓS-VACINAÇÃO**

Orientador: Dr. José Paulo Gagliardi Leite

**EXAMINADORES:**

Dra. Flavia Barreto dos Santos – Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz – Revisor - Presidente da Banca

Dra. Renata Schama Lellis – Instituto Oswaldo Cruz- Fiocruz

Dr. Davis Fernandes Ferreira – Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ

Dra. Myrna Cristina Bonaldo – Instituto Oswaldo Cruz- Fiocruz

Dra. Izabel Christina Nunes de Palmer Paixão – Universidade Federal Fluminense - UFF

Rio de Janeiro, 30 de Maio de 2014.

Aponta pra fé e rema...  
(Marcelo Camelo)

Aos meus pais, pelo amor e apoio durante tantos anos de dedicação à pesquisa científica. À minha irmã e avó, por serem as minhas grandes incentivadoras e ao meu namorado, Thiago, por toda a paciência, amor e dedicação.

## AGRADECIMENTOS

Considero a elaboração de uma tese um produto coletivo embora sua redação e estresse seja predominantemente individual. Várias pessoas contribuíram para que eu chegasse até aqui (o que me torna uma pessoa de sorte) e a todas elas agradeço com todo o meu coração.

À todos os meus familiares, pelo suporte e por sempre me incentivarem, especialmente ao Thiago, pela ajuda com as imagens da tese, por me ouvir pacientemente, por me fazer sorrir quando estou triste e, principalmente por me apoiar sempre.

Ao meu orientador, Dr. José Paulo Gagliardi Leite pela confiança no meu trabalho, constante incentivo, amizade e por se preocupar tanto comigo.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária; Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ); Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES); PAPES VI; Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública – Secretaria de Vigilância em Saúde (CGLAB/SVS), Projeto CAPES-MERCOSUL PPCP 023/2011;

À Dra. Flavia Barreto dos Santos, pelo brilhante trabalho de revisão desta tese e por ser sempre tão gentil e carinhosa comigo.

Aos membros da banca examinadora, pela atenção dispensada a este trabalho.

À Dra. Marize Miagostovich, pela amizade e por sempre me incentivar.

À toda equipe LVCA: Alexandre Fialho, Ana Carolina Ganime, Carmen Baur, Dadade Xavier, Eduardo Volotão, Fabiana Melgaço, Filipe Aníbal, Hugo Resque, Mariela Martínéz, Marilda Almeida, Monica Rocha, Julia Fioretti, Juliana Andrade, Rosane Assis, Silvana Portes, Tatiana Rose, Tulio Fumian e Xica Alves pelos bate-papos inesquecíveis, companhia, amizade e carinho.

À toda equipe de Rotavírus do LVCA: Alexandre Fialho, Eduardo Volotão, Filipe Aníbal, Juliana Andrade, Mariela Martínéz, Rosane Assis e Tatiana Rose, com certeza eu não teria conseguido sem a ajuda de vocês.

Aos meus amigos Alex Alves e Priscila Antunes, por me incentivarem sempre e entenderem a minha ausência.

Às plataformas de sequenciamento PDTIS e do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Biomanguinhos;

A todos os pais e crianças participantes deste estudo.

## ÍNDICE

	<b>Página</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>viii</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b>	<b>viii</b>
<b>LISTA DE QUADROS</b>	<b>viii</b>
<b>LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS</b>	<b>ix</b>
<b>RESUMO</b>	<b>xii</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>xiii</b>
<b>CAPÍTULO I</b>	<b>1</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>2</b>
<b>1.1. Histórico</b>	<b>3</b>
<b>1.2. Organização da partícula viral e genoma</b>	<b>4</b>
<b>1.3. Proteínas Virais</b>	<b>7</b>
<b>1.3.1. Proteínas estruturais</b>	<b>7</b>
<b>1.3.2. Proteínas não-Estruturais</b>	<b>9</b>
<b>1.4. Classificação dos rotavírus da espécie A</b>	<b>13</b>
<b>1.5. Mecanismos de evolução dos rotavírus da espécie A</b>	<b>15</b>
<b>1.5.1. Mutações pontuais</b>	<b>15</b>
<b>1.5.2. Rearranjos genéticos</b>	<b>16</b>
<b>1.5.3. Reestruturação de segmentos gênicos (<i>Reassortments</i>)</b>	<b>17</b>
<b>1.5.4. Recombinação genética</b>	<b>18</b>
<b>1.5.5. Transmissão interespécies</b>	<b>19</b>
<b>1.6. Replicação Viral</b>	<b>20</b>
<b>1.7. Resposta imune humana contra rotavírus da espécie A</b>	<b>22</b>
<b>1.8. Patogênese</b>	<b>24</b>
<b>1.9. Tratamento e prevenção</b>	<b>26</b>
<b>1.10. Epidemiologia dos rotavírus da espécie A</b>	<b>30</b>

<b>2. JUSTIFICATIVA</b>	<b>33</b>
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>35</b>
<b>3.1. GERAL</b>	<b>35</b>
<b>3.2. ESPECÍFICOS</b>	<b>35</b>
<b>4. METODOLOGIAS E RESULTADOS</b>	<b>36</b>
<b>CAPITULO II</b>	<b>37</b>
<b>Gene de VP7 de RVA humano de genótipo G5: análise filogenética revela a existência de três linhagens mundialmente</b>	<b>38</b>
<b>Análise filogenética dos genes que codificam para as proteínas VP1, VP2 e VP3 de cepas de rotavirus A de genótipo G5P[8] circulando no Brasil entre 1986 e 2005</b>	<b>49</b>
<b>CAPITULO III</b>	<b>58</b>
<b>Linhagens de P[8] VP8* de rotavirus A circulando no Brasil por mais de 20 anos no Brasil: Proposta de seis sublinhagens diferentes para a linhagem P[8]-3</b>	<b>59</b>
<b>CAPITULO IV</b>	<b>66</b>
<b>Vacinação com a RV1 no Brasil não tem impacto na circulação de rotavirus A de genótipo G1P[8]: análise da constelação genômica completa</b>	<b>67</b>
<b>CAPITULO V (DISCUSSÃO, CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS)</b>	<b>104</b>
<b>1. DISCUSSÃO</b>	<b>105</b>
<b>1.1. Diversidade genética dos rotavírus da espécie A</b>	<b>105</b>
<b>1.2. Análise da diversidade genética de G5P[8] circulando de 1986 a 2005 no Brasil</b>	<b>107</b>
<b>1.3. Análise das linhagens de P[8] de cepas de rotavírus da espécie A circulando no Brasil de 1986 a 2011</b>	<b>111</b>
<b>1.4. Análise da constelação gênica de cepas brasileiras de genótipo G1P[8] circulando no Brasil entre 1986 e 2013</b>	<b>113</b>
<b>2. CONCLUSÕES</b>	<b>117</b>
<b>3. PERSPECTIVAS</b>	<b>118</b>

<b>4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>119</b>
<b>APÊNDICE: ANÁLISE FILOGENÉTICA DOS GENES QUE CODIFICAM PARA AS PROTEÍNAS VP6, NSP1, NSP2, NSP3, NSP4 E NSP5</b>	<b>144</b>



## LISTA DE FIGURAS

	Páginas
<b>Figura 1. Estrutura da partícula viral de rotavírus da espécie A</b>	<b>4</b>
<b>Figura 2. Esquema estrutural do genoma e partículas virais dos rotavírus da espécie A</b>	<b>6</b>
<b>Figura 3. Esquema representativo de rearranjo gênico em rotavírus da espécie A</b>	<b>17</b>
<b>Figura 4. Esquema representativo de <i>reassortment</i> em rotavírus da espécie A</b>	<b>18</b>
<b>Figura 5. Esquema representativo de recombinação genética em rotavírus da espécie A</b>	<b>19</b>
<b>Figura 6. Esquema da biossíntese dos rotavírus da espécie A</b>	<b>22</b>
<b>Figura 7. Distribuição dos genótipos de rotavírus da espécie A no Brasil entre 2005 e 2009</b>	<b>32</b>

## LISTA DE TABELAS

	Páginas
<b>Tabela 1. Valores de corte de percentagem de identidade nucleotídica que definem os diferentes genótipos de rotavírus da espécie A, considerando-se os 11 segmentos genômicos.</b>	<b>15</b>

## LISTA DE QUADROS

	Páginas
<b>Quadro 1. Segmentos genômicos dos rotavírus da espécie A, localização na partícula viral, proteínas virais codificadas e suas respectivas funções.</b>	<b>12</b>
<b>Quadro 2. Resumo apresentando os mecanismos envolvidos na geração de diarreia pelos rotavírus da espécie A.</b>	<b>25</b>
<b>Quadro 3. Vacinas rotavirus da espécie A em desenvolvimento e/ou licenciadas para uso mundialmente</b>	<b>28</b>

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

aa – Aminoácido

ADN – Ácido desoxirribonucléico

AG – Do inglês: *Acute gastroenteritis*

Bases: A – Adenina; C – Citosina; G – Guanina; U - Uracila

Ca<sup>2+</sup> – Íon cálcio

Cl<sup>-</sup> – Íon cloro

CpG - Do inglês: *Cytosine-phosphate-Guanine*

DLP – Do inglês: *Double Layer Particles* – Partículas virais de camada dupla

eIF-4G1 - Do inglês: *Eukaryotic translation initiation factor 4-gamma 1*

EGPA – Eletroforese em gel de poliacrilamida

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

GA – Gastroenterite Aguda

GAVI – Do inglês: *Global Alliance for Vaccines and Immunisation* - Aliança Mundial para Vacinas e Imunização

GpC - Do inglês: *Guanine-phosphate-Cytosine*

HAV - Do inglês: *Hepatitis A virus* - Vírus da hepatite A

HIV-1 - Do inglês: *Human immunodeficiency virus type* - Vírus da imunodeficiência humana tipo 1

HSP - Do inglês: *Heat Shock Proteins* – Proteínas do choque térmico

INF – Do inglês: *Interferon* - Interferon

ICTV – Do inglês: *International Committee on Taxonomy of Viruses* – Comitê Internacional de Taxonomia dos vírus

IOC – Instituto Oswaldo Cruz

IRF – Do inglês: *Interferon regulatory factors* - Fatores reguladores do Interferon

LRRR - Laboratório de Referência Regional para Rotavírus

LVCA – Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental

ME – Microscopia eletrônica

MS – Ministério da Saúde

NDPkinase - Do inglês: *Nucleoside diphosphate kinase*

NF  $\kappa\beta$  – Do inglês: *Nuclear factor  $\kappa\beta$*  - fator nuclear  $\kappa\beta$

NIP – Do inglês: *National Immunization Program*

nm – Nanômetros

Nc – Do inglês: *Effective number of códon*

NSP – Do inglês: *Non structural protein* – Proteína não-estrutural

nt – Nucleotídeo

NTPase - Do inglês: *nucleoside triphosphatase*

NTPs - Do inglês: *nucleoside triphosphates* – Nucleosídeo trifosfato

OMS – Organização Mundial da Saúde

OPAS – Organização Pan Americana da Saúde

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

PABP- Do inglês: *Poly(A)-binding protein* - Proteína de união à cauda Poli A

PAHO – Do inglês: *Pan American Health Organization*

pb – Pares de bases

PCs - Do inglês: *Polimerase complexes* - Complexos da polimerase viral

PNI – Programa Nacional de Imunização

RCWG – Do inglês: *Rotavirus Classification Working Group*

RE – Retículo endoplasmático

RNA – Ácido ribonucleico

RNA(+) – Ácido ribonucleico de polaridade positiva

RNA(-) – Ácido ribonucleico de polaridade negativa

RNA<sub>df</sub> – Ácido ribonucleico de dupla fita

RNA<sub>m</sub> – Ácido ribonucleico mensageiro

RNA<sub>sf</sub> – Ácido ribonucleico de fita simples

RNA<sub>t</sub> - Ácido ribonucleico de transferência

RTPase - Do inglês: *Ribonucleic acid triphosphatase*

RV – Rotavírus

RVA – Rotavírus da espécie A

RVE – Rotavírus da espécie E

RVF – Rotavírus da espécie F

RVG – Rotavírus da espécie G

RV1 – Do inglês: *Rotarix vaccine* - Vacina monovalente (G1P[8]) Rotarix<sup>®</sup> - RV1

RV5 – Do inglês: *Rotateq vaccine* - Vacina pentavalente (G1-4, P[8]) Rotateq<sup>®</sup> - RV5

SA11 – Do inglês: *Simian rotavirus A 11* – Rotavírus A símio

SAGE – Do inglês: *Strategic Advisory Group of Experts on Immunization* - Grupo de Assessoria Estratégica de Especialistas em Imunização

SLP- Partícula de camada simples

tc – Do inglês: *tissue culture*

TLR9 – Do inglês: *Toll-like 9*

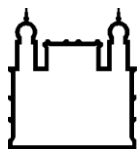
USA – Estados Unidos de América

VP – Do inglês: *Viral structural protein* - Proteína estrutural

VLP – Do inglês: *Virus-like Particles* - Partículas semelhantes a vírus

WHO – Do inglês: *World Health Organization*

wt – Do inglês: *wild type*



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

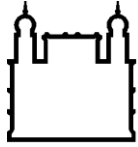
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

## ROTAVÍRUS A GENÓTIPOS G5 E G1 ASSOCIADOS AO GENÓTIPO P[8] CIRCULANDO NO BRASIL DE 1986 A 2013: VARIABILIDADE GENÉTICA PRÉ E PÓS-VACINAÇÃO

Marcelle Figueira Marques da Silva

### RESUMO

Os rotavírus da espécie A (RVA) são os principais agentes etiológicos causadores de gastroenterite aguda (GA) em crianças  $\leq 5$  anos e, anualmente, são responsáveis por aproximadamente 196.000 casos de óbito infantil em todo o mundo. Diferentes mecanismos genéticos (mutações pontuais, rearranjos genéticos, reestruturação de segmentos genômicos (reassortment) e recombinação genética) estão envolvidos na geração de variabilidade genética destes vírus. As combinações genotípicas mais encontradas mundialmente são: G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8] e G9P[8], entretanto, os países em desenvolvimento apresentam uma maior variabilidade genotípica entre as cepas circulantes. No intuito de se compreender a diversidade dos RVA, em 2011 foi proposto um novo sistema de classificação para os RVA baseado no sequenciamento nucleotídico dos onze segmentos gênicos destes vírus. No presente estudo foram realizadas análises filogenéticas dos onze genes de 28 cepas brasileiras de RVA de genótipo G5P[8] coletadas entre 1986 e 2005, 90 cepas de RVA de genótipo G1P[8] em diferentes regiões brasileiras entre 1986 e 2013, além do perfil de flutuação do genótipo P[8] no Brasil durante as últimas 3 décadas. Os resultados demonstraram que as cepas brasileiras de genótipo G5P[8] e G1P[8] possuem uma constelação gênica do genótipo *Wa-like* (II-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1), com exceção de duas cepas G1P[8], que apresentaram o genótipo T3 (genótipo *AU-1-like*), comumente detectado em felinos. Foi proposta a classificação do genótipo G5 em 3 linhagens diferentes (I, II e III), de modo que a linhagem I circulou no Brasil entre 1986 e 2005 e a linhagem que está circulando atualmente entre países dos continentes Africano e Asiático pertencem à linhagem III. Os resultados permitiram demonstrar que a prevalência do genótipo G1P[8] variou anualmente no Brasil e que o genótipo G1 circulou em associação com as linhagens P[8]-1, P[8]-2 e P[8]-3 no país. A vacina RV1 apresenta especificidade P[8]-1, enquanto as cepas que estão circulando atualmente são P[8]-3. A análise do perfil de P[8] no Brasil demonstrou que no país circularam as linhagens P[8]-1, P[8]-2 e P[8]-3 e a variabilidade verificada para a linhagem P[8]-3 permitiu a sua classificação em 6 sublinhagens (P[8]-3.1 – P[8]-3.6). Portanto, a melhoria dos programas de vigilância de RVA através de estudos que incluam a análise dos 11 segmentos gênicos das cepas circulantes no país contribuirá para entender melhor alguns pontos ainda não esclarecidos a respeito da biologia dos RVA, como de que maneira a introdução de um esquema de vacinação em massa pode influenciar na circulação de RVA em humanos e animais e a real frequência de detecção de eventos de reassortment entre cepas de espécies diferentes ou entre cepas selvagem e vacinal na população.



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

ROTAVIRUS A GENOTYPES G5 AND G1 ASSOCIATED TO GENOTYPE P[8] CIRCULATING  
IN BRAZIL FROM 1986 TO 2013: GENETIC VARIABILITY BEFORE AND AFTER  
VACCINATION

Marcelle Figueira Marques da Silva

ABSTRACT

Species A rotaviruses (RVA) are the main etiological agent of acute gastroenteritis (AG) in children  $\leq 5$  years old and, annually, are responsible for about death of 196.000 children worldwide. Different genetic mechanisms (point mutation, genetic rearrangement, reassortment and genetic combination) are involved in the generation of variability of these viruses. The most detected combinations worldwide are: G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8] and G9P[8], however developing countries have strains with a greater genotypic variability. In order to understand the RVA diversity, in 2011, was proposed a new classification system for RVA based on the nucleotide sequencing of the 11 gene segments. In the present study were conducted Phylogenetic analyses of the 11 gene segments from 28 Brazilian RVA strains genotype G5P[8] collected between 1986 and 2005, 90 RVA strains genotype G1P[8] collected between 1986 and 2013 in different regions of the country, besides the analysis of the fluctuation profile from genotype P[8] during the last 3 decades in Brazil. The results showed that Brazilian RVA strains genotypes G5P[8] and G1P[8] have a genetic constellation characteristic of the genotype *Wa-like* (II-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1), except for 2 G1P[8] strains, which showed genotype T3 (*AU-1-Like*), generally detected in felines. Was proposed the classification of genotype G5 in 3 different lineages (I, II and III), lineage I circulated in Brazil between 1986 and 2005, while the lineage actually circulating in African and Asiatic continents is lineage III. The results demonstrated that the G1P[8] prevalence in Brazil changed annually and genotype G1 circulated in Brazil in association to P[8]-1, P[8]-2 and P[8]-3 lineages. RV1 vaccine shows P[8]-1 specificity, whilst the actually circulating strains have P[8]-3 specificity. The analysis of the P[8] genotype profile demonstrated that P[8]-1, P[8]-2 and P[8]-3 lineages circulated in Brazil and the P[8]-3 variability enabled the classification into 6 sublineages (P[8]-3.1 – P[8]-3.6). Therefore, the enhancement of surveillance RVA programs through studies that include analysis of the 11 gene segments of strains circulating in the country contribute to better understand some points that remain unclear about the RVA biology, such as how the introduction of a mass vaccination scheme can influence the circulation of RVA in humans and animals and the actual frequency of reassortment events between strains of different species or between wild and vaccine strains in the population.

# **CAPITULO I**

## **OS ROTAVÍRUS DA ESPÉCIE A (RVA)**

## 1. INTRODUÇÃO

A gastroenterite aguda (GA) é uma infecção do trato gastrointestinal cuja manifestação predominante é o aumento do número de evacuações, com fezes aquosas ou de pouca consistência, podendo ter diversas etiologias: bactérias, vírus, parasitas e toxinas. A GA é, mundialmente, um dos mais importantes agravos à saúde e a principal causa de morbimortalidade em crianças  $\leq 5$  anos de idade (Black *et al.*, 2010). A GA afeta de maneira desproporcional as crianças de países em desenvolvimento, que apresentam uma taxa de mortalidade mais elevada devido principalmente à má qualidade da água potável, saneamento básico e fatores de risco nutricionais, como a amamentação por um tempo inferior ao adequado, deficiência de zinco e vitamina A, além do precário serviço de assistência médica (Brown *et al.*, 2009; Lamberti *et al.*, 2011).

No Brasil, um país de dimensões continentais e com grande heterogeneidade socioeconômica, os dados de monitoramento da GA entre os anos 2000 e 2011 contabilizaram um total de 33.397.413 de casos notificados (Secretaria de Vigilância em Saúde/ Ministério da Saúde. Fonte: <http://portal.saude.gov.br> Acesso em 02/04/2014 às 10:00h). Entretanto, diversos estudos documentam de forma evidente a diminuição significativa das taxas de morbimortalidade associadas à GA no Brasil e mundialmente (Barros *et al.*, 2010; do Carmo *et al.*, 2011, WHO/UNICEF, 2013).

Os vírus são importantes agentes etiológicos de GA e dentre os mais comuns estão aqueles pertencentes às famílias *Reoviridae*, *Astroviridae*, *Caliciviridae* e *Adenoviridae*. Do ponto de vista clínico, a GA causada por vírus não pode ser distinguida daquela causada pelos outros agentes, sendo geralmente um processo auto-limitado de diarreia e vômito, com duração aproximada de 1 a 7 dias (Wilhelmi *et al.*, 2003).

Os rotavirus da espécie A (RVA) são os principais agentes etiológicos causadores de GA em crianças  $\leq 5$  anos com a ocorrência de, aproximadamente, 196.000 mortes por ano mundialmente (Walker *et al.*, 2013). Em 2006 e 2007 a Organização Panamericana de Saúde (OPAS) e o Grupo de Assessoria Estratégica de Especialistas em Imunização (SAGE) da Organização Mundial de Saúde (OMS), declararam que a introdução de uma vacina RVA era prioridade nas Américas com a meta de prevenir as mortes e hospitalizações causadas por RVA (WHO, 2009). Duas vacinas foram recomendadas: a vacina G1P[8] monovalente



Rotarix<sup>®</sup> (RV1) (*GlaxoSmithKline* [GSK], Rixensart, Bélgica) e a vacina G1-G4P[8] pentavalente, RotaTeq<sup>®</sup> (RV5) (Merck, North Wales, PE, EUA).

## 1.1. HISTÓRICO

No início da década de 1970 foram realizados estudos utilizando a microscopia eletrônica (ME) de fezes diarreicas obtidas de voluntários infectados com suspensões fecais. Dentre as suspensões fecais utilizadas nas inoculações, uma era originária de um surto de GA ocorrido na cidade de Norwalk, nos Estados Unidos da América (USA), em 1968. As suspensões produziam diarreia aguda em voluntários e, em uma das amostras de fezes diarreicas, foram visualizadas partículas virais medindo 27 nanômetros (nm) de diâmetro, atualmente denominadas norovírus. Este fato correspondeu à primeira descrição de um agente viral como etiologia de diarreia aguda em humanos (Kapikian *et al.* 1972).

Após um ano, Bishop e colaboradores (1973) descreveram a presença de vesículas citoplasmáticas contendo partículas virais semelhantes aos Orbivirus e por este motivo esses vírus receberam o nome de *Orbivirus-like agent*. Partículas virais também foram descritas por Flewett e colaboradores (1974) em fezes de crianças com GA. Logo após, estes vírus foram denominados Duovirus (Davidson *et al.*, 1975) e, finalmente, foi proposta a denominação rotavírus (RV) devido ao aspecto de roda do vírus quando examinado através da técnica de ME (Figura 1A) e a constituição de um novo gênero, denominado *Rotavirus*, dentro da família *Reoviridae* foi estabelecido (Flewett & Wood, 1978). No Brasil, os RV foram descritos pela primeira vez por Linhares e colaboradores (1977) ao examinarem fezes de crianças com GA através da ME. De acordo com o 9º Informe do Comitê Internacional de Taxonomia Viral (ICTV 2012), os determinantes antigênicos de grupo conferidos pela proteína VP6 permitem a classificação dos RV em 5 espécies sorológicas: Rotavirus da espécie A (RVA), Rotavirus da espécie B (RVB), Rotavirus da espécie C (RVC), Rotavirus da espécie D (RVD) e Rotavirus da espécie E (RVE) (<http://ictvonline.org>), além de 3 tentativas adicionais de espécies: Rotavirus da espécie F (RVF), Rotavirus da espécie G (RVG) e Rotavirus da espécie H (RVH) (Van Regenmortel *et al.*, 2005; Ball, 2005; Johne *et al.*, 2011; Matthijnsens *et al.*, 2011; Patton, 2012; Estes & Greenberg, 2013).

## 1.2. ORGANIZAÇÃO DA PARTÍCULA VIRAL E GENOMA

A partícula viral infecciosa (vírion) apresenta aproximadamente 100 nm de diâmetro, simetria icosaédrica, é desprovida de envelope e constituída por três camadas proteicas (capsídeo interno, intermediário e externo), Figura 1B, 1C e 1D. O capsídeo mais interno (core viral) é composto por 120 cópias da proteína VP2. A região terminal da proteína VP2 está livre e acredita-se que mantenha contato com o complexo da polimerase viral composto pelas proteínas VP1, a RNA polimerase RNA-dependente viral e VP3, que possui atividades guanilil e metiltransferase (McClain *et al.*, 2010). O capsídeo intermediário é constituído por 260 trímeros da proteína VP6 que conferem estabilidade à camada mais interna, além de funcionar como um adaptador para o capsídeo externo, que é essencial para a adsorção e penetração do vírus na célula. Esta última camada é composta por trímeros da glicoproteína VP7, diretamente posicionados sobre a proteína VP6. Os trímeros de VP7 são dependentes de íons cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), os quais mantêm a sua estabilidade. Além da proteína VP7, no capsídeo externo encontram-se 60 trímeros da proteína VP4, que apresenta diferentes mudanças conformacionais durante a penetração na membrana da célula hospedeira (Patton, 2012).

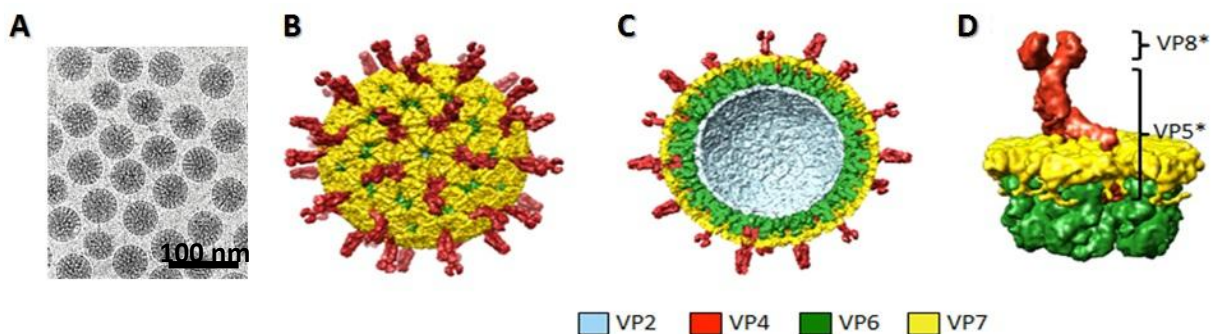


Figura 1. Estrutura da partícula viral dos rotavírus da espécie A. A) Partícula viral visualizada através da técnica de microscopia eletrônica B) Esquema da estrutura do vírion; C) Triplo capsídeo proteico; D) Esquema da estrutura da proteína VP4. Adaptado de Patton (2012); Estes & Greenberg (2013).

A estrutura tridimensional dos RVA tem sido estudada por criomicroscopia eletrônica associada a programas de bioinformática, que realizam o processamento de imagens (Dormitzer *et al.*, 2004). Esses estudos explicam quais estruturas moleculares estão envolvidas nos mecanismos de adsorção, penetração, replicação, liberação e neutralização dos RVA, contribuindo para o entendimento a respeito dos aspectos funcionais dessas estruturas.

O fato de os vírions serem formados por um triplo capsídeo implica na observação de três tipos diferentes de partículas em microscópio eletrônico. A partícula completa é infecciosa e chamada de “partícula com tripla camada” (TLP – *triple-layered particle*). A partícula desprovida do capsídeo externo é chamada de “partícula com dupla camada” (DLP – *double-layered particle*). Na DLP é possível observar o capsídeo intermediário formado por trímeros da proteína estrutural VP6. A DLP também é chamada de “partícula rugosa”, devido às projeções proteicas do capsídeo interno. O terceiro tipo de partícula é formado exclusivamente pelo capsídeo interno sendo denominada “partícula de camada simples” (SLP – *single-layered particle*) e está associada ao genoma viral (Estes & Greenberg, 2013).

O genoma completo dos RVA contém aproximadamente 18.552 pares de bases (pb) com massa molecular de  $2,0 \times 10^5$  a  $2,0 \times 10^6$  Dáltons, sendo constituído por 11 segmentos de RNA de dupla fita (RNAdf) que variam entre 667 (segmento 11) e 3302 (segmento 1) pb, codificando 6 proteínas estruturais (VP1-4, VP6-7) e 5 ou 6 proteínas não estruturais (NSP1-6) (Estes & Greenbeg, 2013) (Figura 2). Os segmentos de RNAdf são compostos por uma fita de polaridade positiva e outra negativa que se pareiam de ponta a ponta, garantindo uma maior estabilidade. A cepa protótipo SA11 (origem símia) foi a primeira a ter seu genoma totalmente sequenciado. Atualmente, diversas cepas de RVA provenientes de humanos e animais possuem as sequências de nucleotídeos dos seus 11 segmentos completamente ou parcialmente sequenciadas.

As sequências de RVA são ricas em adenina e uracila (58-67%), sendo esta característica compartilhada com muitos genes eucarióticos e virais. A fita positiva contém na extremidade 5' um *Cap* formado pela sequência  $m^7GpppG^{(m)}GPy$ . Características semelhantes nas porções terminais do RNA dos RVA (*Cap* na extremidade 5' e sequências conservadas na extremidade 3') também são encontradas nas estruturas primárias do genoma de outros vírus segmentados, como os reovírus e os orbivírus, ambos pertencentes à família *Reoviridae* (Estes & Greenbeg, 2013).

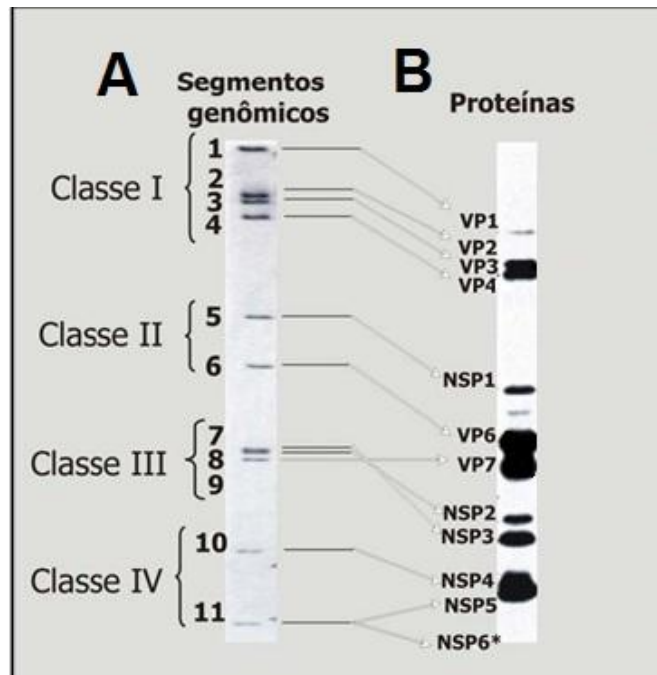


Figura 2. Esquema estrutural do genoma dos rotavírus da espécie A. A: Eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) dos 11 segmentos do genoma do rotavírus símio (SA-11). B: Gel de poliacrilamida mostrando a separação das proteínas estruturais (NSP1 – NSP6) e não estruturais (VP1 – VP4, VP6 – VP7) sintetizadas pelo rotavírus SA-11 (Adaptada de Conner & Ramig, 1997).

A fase aberta de leitura (ORF “*Open Reading Frame*”) encontra-se flanqueada pelas regiões não codificantes 5´ e 3´ que podem variar em quantidade de pb mas que apresentam em comum pequenas sequências nucleotídicas, que sinalizam para a transcrição, transporte de RNA, replicação, montagem ou empacotamento dos segmentos gênicos (Patton *et al.*, 1999; Estes & Greenberg, 2013). Todos os 11 segmentos devem apresentar os mesmos sinais de ativação em *cis* já que são todos replicados pela mesma polimerase. Além disso, cada segmento deve conter um sinal único porque estes devem ser distinguidos um dos outros durante o empacotamento (Estes & Greenberg, 2013).

### 1.3. PROTEÍNAS VIRAIS

#### 1.3.1– Proteínas Estruturais (VP)

A proteína VP1 é a RNA polimerase dependente de RNA viral que apresenta função de replicase e transcriptase. Possui estrutura compacta, globular de aproximadamente 70 Å de diâmetro e contém quatro canais diferentes que levam ao seu centro catalítico. Acredita-se que os quatro canais estejam envolvidos na entrada dos RNA de polaridade (+) (RNA+) e RNA de polaridade (-) (RNA-); na entrada dos nucleotídeos trifosfato (*NTP* “*nucleoside triphosphates*”); na saída dos RNAdf e RNA(-); e na saída dos RNA(+) (Estes & Greenberg, 2013).

A VP2 é a proteína mais abundante do capsídeo interno, faz parte do complexo de replicação e associa-se tanto à VP1 quanto à VP3 através de um domínio na sua porção N-terminal (Arnoldi *et al.*, 2007). Estudos demonstraram que para a ativação de VP1 é necessário que ocorra a sua interação com o domínio principal da proteína VP2. A porção N-terminal da proteína VP2 forma um canal em cada um dos cinco eixos da partícula viral que é fundamental para que ocorra a encapsidação das proteínas VP1 e VP3, interações com o RNAdf e síntese do RNAdf (McDonald & Patton, 2011). Além disso, VP2 também interage com a proteína VP6 nos estágios iniciais da morfogênese viral. A interação entre estas duas proteínas (VP2 e VP6) é fundamental para a formação de partículas imaturas ou incompletas, ou seja, aquelas que possuem apenas duplo capsídeo proteico (*DLP*) e confere à partícula maior homogeneidade morfológica e estabilidade em longo prazo (Estes & Greenberg, 2013).

Estudos demonstraram que a proteína VP3 apresenta atividades guanidil e metiltransferase e que é a enzima responsável pela adição da CAP ao RNA (Patton, 1995; Subodh *et al.*, 2006; McDonald & Patton, 2011).

A proteína VP4 apesar de estar em menor quantidade no capsídeo externo desempenha funções importantes no ciclo replicativo, não só pela adsorção e internalização à célula, mas também hemaglutinação, neutralização e virulência (Both *et al.*, 1994; Estes & Greenberg, 2013). É susceptível à proteólise, o que resulta na exposição de sítios ativos que proporcionam a penetração do vírus na célula (Arias *et al.*, 1996; Estes & Greenberg, 2013). A ativação da proteína VP4 requer clivagem proteolítica da mesma, gerando dois peptídeos VP5\* e VP8\*, os quais permanecem associados ao vírion. O peptídeo VP5\* tem atividade de neutralização cruzada entre os diferentes tipos de VP4 e, possivelmente, possui os epítomos

responsáveis pela adsorção do vírus à célula (Kirkwood et al., 1996). Foi demonstrado que algumas estirpes de RVA interagem com integrinas ou proteínas de choque térmico (*HSP* “*Heat Shock Proteins*”) antes ou após a ligação do RVA à célula hospedeira (Guerrero et al., 2000; Zárate et al., 2003). O peptídeo VP8\* contém a maioria dos epítomos associados às reações tipo-específicas, dependentes da ligação deste com ácido siálico (Isa et al., 1997). Cinco epítomos de neutralização foram mapeados em VP5\* (5-1 a 5-5) e quatro em VP8\* (8-1, 8-4) (Trask et al., 2012; Estes & Greenberg, 2013).

A proteína VP6 é a proteína mais abundante do vírus, representando aproximadamente 51% da partícula viral. Provavelmente esta seja a causa pela qual a maioria dos anticorpos gerados durante a infecção dos RVA seja contra esta proteína (Svensson et al., 1987). A proteína VP6 é formada por dois domínios: um que interage com VP7 e VP4 do capsídeo externo e outro que interage com VP2 do core. Assim, VP6 participa em duas funções importantes para os RVA: a) adsorção e penetração na célula; b) transcrição do RNAdf (Heiman et al., 2008), além de ser responsável pela classificação dos RVA em subgrupos denominados SGI, SGII, SG I+II e SG não-I não-II.

A glicoproteína VP7 é a mais imunogênica do capsídeo externo, modula a atividade de VP4 no processo de adsorção e entrada dos RVA na célula, interagindo com proteínas da família das integrinas, na superfície celular, após o processo de adsorção mediado pela porção VP5\* da proteína VP4 (Guerrero et al., 2000). Estudos têm demonstrado que concentrações apropriadas de  $Ca^{2+}$  são necessárias para manter a estabilidade da partícula viral, aparentemente pela estabilidade de VP7. Na sua ausência, os trímeros da proteína encontram-se dissociados, promovendo a liberação da VP7 do vírion. Essa mudança conformacional de VP7 reflete em um arranjo distinto para a proteína VP4, que possibilita a entrada do vírion na célula. Aoki e colaboradores (2009) demonstraram que anticorpos neutralizantes contra a proteína VP7 estabilizam o trímero formado pela proteína, inibindo as alterações em VP4, necessárias para permitir a entrada do vírus na célula hospedeira.

### 1.3.2- Proteínas Não estruturais (NSP)

A proteína NSP1, codificada pelo segmento genômico 5, é a proteína viral menos conservada (Dunn *et al.*, 1995) e apresenta associações com o citoesqueleto celular favorecendo a ligação vírus-célula (James *et al.*, 1999). Esta proteína é capaz de modular a ativação de interferon (*IFN*) tipo I. A produção de *IFN* é crítica para desencadear uma resposta imune inespecífica em casos de infecção viral. A NSP1 antagoniza a resposta imune, via indução da degradação de um ou mais componentes necessários para expressão do *IFN* tipo I, via fatores regulatórios do *IFN* 3, 5 e 7 (*IFR* “*Interferon regulatory factors*”) ou via fatores nucleares  $\kappa\beta$  (*NF*  $\kappa\beta$  “*Nuclear Factor*  $\kappa\beta$ ”) (Barro & Patton, 2005; Graff *et al.*, 2009).

A proteína NSP2 é frequentemente encontrada associada à NSP5, ambas formam estruturas conhecidas como viroplasmas. NSP2 é altamente conservada sendo expressa em altas concentrações nas células infectadas, provavelmente porque é uma proteína com diversas funções importantes para a formação do vírion (Estes & Grenberg, 2013). A proteína NSP2 é capaz de se unir ao RNAs e tem atividade de helicase, *NTPase* (*Nucleoside triphosphatase*), *NDPkinase* (*Nucleoside diphosphate kinase*) e *RTPase* (*Ribonucleic acid triphosphatase*) (Taraporewala *et al.*, 1999, 2001; Caprio *et al.*, 2006; Kumar *et al.*, 2007). A NSP2 participa da transcrição, tradução, replicação e empacotamento do RNAd (Estes & Greenberg, 2013).

A proteína NSP3, codificada pelo segmento 7, apresenta três domínios: o domínio N-terminal de união ao RNAs (Aminoácido (aa) 1 – 170); o domínio de interação com eIF-4G1 (*Eukaryotic translation initiation factor 4-gamma 1*), formado pelos últimos 107 resíduos da região C terminal e o domínio de dimerização (aa 150 – 206) (Piron *et al.*, 1999). Estudos demonstraram que a proteína NSP3 compete com a proteína de união à cauda Poli A na célula hospedeira (*PABP* “*PolyA-binding protein*”) o que sugere que a proteína poderia favorecer a tradução do RNAm e a interrupção da síntese proteica da célula hospedeira. Porém, estudos demonstraram que a NSP3 não é fundamental para a tradução do RNA viral (Padilla-Noriega, *et al.*, 2002; Varani & Allain, 2002; Montero *et al.*, 2006) Além disso, observou-se que a mesma estaria implicada no espalhamento extra-intestinal do vírus no hospedeiro infectado. Entretanto, ainda não foi elucidado qual mecanismo estaria envolvido nesse processo (Mossel & Ramig, 2002, 2003).

A proteína NSP4, codificada pelo segmento 10, foi a primeira enterotoxina viral descrita (Ball *et al.*, 1996). Esta proteína se localiza em diversos sítios dentro da célula e participa dos eventos de morfogênese, replicação e patogênese dos RVA. A proteína inteira se localiza ancorada no retículo endoplasmático (RE) através do domínio hidrofóbico N-terminal, enquanto a região C-terminal se encontra no citoplasma. A região entre os aa 45 e 175 constitui a região citoplasmática e retém todas as propriedades biológicas importantes associadas a esta proteína, incluindo a mobilização do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular e permeabilização da membrana; união ao  $\text{Ca}^{2+}$  e a VP4, união às partículas semelhantes a vírus (*VLP* “*Virus-like Particles*”) e indução da diarreia em camundongos. Foi observado que uma forma secretada desta proteína contendo os aa 112 a 175 é capaz de induzir diarreia assim como a proteína completa (Zhang *et al.*, 2000).

O segmento 11 apresenta duas *ORF*. A maior porção codifica a proteína NSP5 que possui atividade autoquinase e em células infectadas se apresenta nas formas hipo e hiper fosforiladas (Taraporewala & Patton, 2004). A sua fosforilação é modulada pela interação com a proteína NSP2 (Afrikanova *et al.*, 1998). A outra *ORF* codifica para a proteína NSP6, que interage com NSP5 no viroplasma. Algumas variantes de RVA não codificam esta proteína enquanto outras apresentam baixos níveis de expressão (Taraporewala & Patton, 2004; López *et al.*, 2005).

No quadro 1 estão descritos os segmentos genômicos dos RVA, a localização na partícula viral, além das proteínas virais codificadas e suas respectivas funções.



<b>Segmento genômico codificante</b>	<b>Pares de base (pb)</b>	<b>Proteína codificada</b>	<b>Localização</b>	<b>Função</b>
1	3302	VP1	Core	RNA polimerase RNA-dependente
2	2690	VP2	Core	Proteína ligante ao RNA
3	2591	VP3	Core	Metil e Guanil-transferase
4	2362	VP4	Capsídeo externo	Espícula de superfície
		VP5*		Antígeno de neutralização (P)
		VP8*		Proteína de adsorção à célula hospedeira
				Clivada por tripsina em VP5* e VP8*
				Responsável pela infectividade viral
5	1611	NSP1	Não estrutural	Antagonista de Interferon
				Alta diversidade intraespecífica
				Possível papel como fator de virulência
6	1356	VP6	Capsídeo intermediário	Proteína hidrofóbica
				Determina antígeno de grupo e subgrupo
7	1104	NSP3	Não estrutural	Associada ao citoesqueleto
				Atua de forma semelhante a proteína de ligação poli(A) celular
				Inibe a síntese de proteína celular
8	1059	NSP2	Não estrutural	Possível papel na replicação viral
				Associada à VP1
				Envolvida na formação do viroplasma
9	1062	VP7	Capsídeo externo	Antígeno de neutralização
				Sítio de ligação para íons cálcio

10	751	NSP4	Não estrutural	Glicoproteína transmembrânica do Retículo endoplasmático rugoso Papel na morfogênese Enterotoxina Viral Sítio de ligação para íons cálcio
11	667	NSP5	Não estrutural	Atividade auto-quinásica Interage com NSP2 Sofre fosforilação Ligada ao RNAdf Gene bicistrônico
11	667	NSP6	Não estrutural	Atua na formação do viroplasma Interage com NSP5 Gene bicistrônico

Fonte: Estes, 2001 modificada pelo autor

Quadro 1. Segmentos genômicos dos rotavírus da espécie A, localização na partícula viral, proteínas virais codificadas e suas respectivas funções.

Durante o processo de replicação viral, as proteínas NSP2, NSP5 e NSP6 estão associadas à formação do viroplasma (Estes & Greenberg, 2013). Na ausência de outras proteínas virais, a interação entre NSP2 e NSP5 resulta em partículas defectivas semelhantes às *VLPs in vitro*. A NSP5 também interage com a VP1 e a VP2. Estudos baseados no silenciamento do gene que codifica para esta proteína demonstraram que a mesma é essencial para a replicação e encapsidação do vírus (Campagna *et al.*, 2005; López *et al.*, 2005).

#### 1.4. CLASSIFICAÇÃO DOS ROTAVÍRUS DA ESPÉCIE A

A classificação dos RVA pode ser baseada no padrão de hibridização do genoma completo de RNA (genogrupos); nas propriedades antigênicas da VP6, VP7 e VP4 (subgrupos, sorotipos G e sorotipos P, respectivamente); no padrão de migração dos 11 segmentos de RNAdf em EGPA (longo, curto, super-curto ou atípico); e pela análise das sequências nucleotídicas (genótipos) (Matthijssens *et al.*, 2011; Estes & Greenberg, 2013).

A avaliação de relação genética entre segmentos homólogos do genoma RNAdf dos RVA é avaliada através dos ensaios de hibridação RNA-RNA (Nakagomi *et al.*, 1989) e, mais recentemente, através de comparações diretas entre sequências nucleotídicas de amostras em questão com sequências protótipos disponíveis em bancos de genes online, como o Genbank (Matthijssens *et al.*, 2008).

A VP6, que foi a primeira proteína a ser usada na classificação dos RVA, apresenta diferentes epítomos, os quais permitem classificar o RVA em subgrupos (SG) distintos: SG I (comum em animais e pouco frequente em humanos), SG II (comum em humanos e pouco frequente em animais), SG I+II (pouco frequente em humanos e animais) e, SG não-I não-II (comum em aves e pouco frequente em humanos e animais) (Matthijssens *et al.*, 2008; Estes & Greenberg, 2013). Com base em caracterização molecular, somente 2 grupos (também denominados genogrupos) foram diferenciados entre os RVA: o genogrupo I, formado pelo SG I; e o genogrupo II que contém os SG II, SG I+II e SG não-I não-II (Iturriza-Gómara *et al.*, 2002; Matthijssens *et al.*, 2008b).

Os 11 segmentos genômicos dos RVA apresentam um padrão de migração eletroforético 4-2-3-2 pela técnica de eletroforese. Esse padrão é dividido em quatro classes: Classe I composta pelos segmentos 1, 2, 3 e 4; Classe II composta pelos segmentos 5 e 6; Classe III composta pelos segmentos 7, 8 e 9 e; finalmente, Classe IV composta pelos segmentos 10 e 11 (Lourenço *et al.*, 1981). Os genes 10 e 11 (que compõem a Classe IV) apresentam posições diferentes que variam de acordo com maior ou menor velocidade de migração, caracterizando os padrões eletroforéticos “longo”, “curto” e “super-curto” (Lourenço *et al.*, 1981). Na maioria das vezes, as amostras de RVA com perfil eletroforético “longo” pertencem ao SGII, enquanto aquelas que apresentam perfil eletroforético “curto” pertencem ao SGI (Estes & Greenberg, 2013).

Em 1989, foi estabelecido um sistema binário de classificação para RVA (derivado do sistema de classificação utilizado para os vírus influenza), sendo baseado em reações imunológicas e na estrutura dos genes das duas proteínas que compõem o capsídeo externo (VP7 e VP4), as quais, independentemente, estimulam a produção de anticorpos neutralizantes (Ciarlet & Estes 2002). Dessa forma, as amostras de RVA são classificadas em VP4 ou “sorotipos P” (P refere-se à sensível à protease – *protease sensitive*) e VP7 ou “sorotipos G” (G refere-se à glicoproteína - *glycoprotein*) (Matthijnssens *et al.*, 2008; Estes & Greenberg, 2013).

Com o advento da biologia molecular, principalmente a reação em cadeia pela polimerase e o sequenciamento genético, a classificação antigênica vem sendo gradualmente substituída pelo sistema de classificação das proteínas VP4 e VP7 em “genótipos” com base na identidade entre as sequências dos segmentos de genes cognatos de RVA (Matthijnssens *et al.*, 2008). Mais recentemente, um novo sistema de classificação baseada na análise das sequências nucleotídicas dos 11 genes dos RVA foi estabelecido pelo *Rotavirus Classification Working Group (RCWG)* (Matthijnssens *et al.*, 2011), Tabela 1. Este novo sistema de classificação recomenda nomear a sequência viral obtida considerando-se os seguintes parâmetros: a espécie de rotavírus; a sua origem (humana ou animal), identificando também se a sequência foi obtida a partir de vírus selvagem (wt “*wild type*”) ou vírus em cultura celular (tc “*tissue culture*”); o país em que foi detectado o vírus, utilizando o código padrão de 3 letras; o nome comum dado pelo pesquisador; o ano de detecção; os genótipos G e P da seguinte forma: GXP[X]. Com base nesta nomenclatura, foram descritos até o momento 27 G-, 37 P-, 17 I-, 9 R-, 9C-, 8 M-, 16 A-, 10 N-, 12 T-, 15 E-, e 11 H genótipos de RVA. Cada letra maiúscula corresponde, respectivamente, aos genes que codificam para as proteínas VP7-VP4-VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5/6 (Matthijnssen *et al.*, 2011).

No caso de o vírus apresentar uma constelação genômica I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1, I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2, ou I3-R3-C3-M3-A3-N3-T3-E3-H3 se classifica como pertencente ao genótipo 1 (ou *Wa-like*), 2 (ou *DS-1-like*), 3 (ou *AU-1-like*), respectivamente (Matthijnssen & Van Ranst, 2012).

<b>Gene</b>	<b>Valor de corte de identidade nucleotídica (%)</b>	<b>Genótipos</b>	<b>Designação dos nomes dos genótipos</b>
VP7	80	27G	<b>G</b> licoproteína
VP4	80	37P	Sensível a <b>P</b> rotease
VP6	85	17I	Capsídeo <b>I</b> nterno
VP1	83	9R	<b>R</b> NA Polimerase Dependente de RNA
VP2	84	9C	Proteína do <b>C</b> erne
VP3	81	8M	<b>M</b> etiltransferase
NSP1	79	16A	Antagonista do Interferon
NSP2	85	10N	<b>N</b> TPase
NSP3	85	12T	Promotor <b>T</b> raducional
NSP4	85	15E	<b>E</b> nterotoxina
NSP5	91	11H	Fosfoproteína ( <b>p</b> hosphoprotein)

Tabela 1. Valores de corte de percentagem de identidade nucleotídica que definem os diferentes genótipos de rotavírus da espécie A, considerando-se os 11 segmentos genômicos. Adaptado de Matthijnssens e colaboradores, (2011).

## **1.5. MECANISMOS DE EVOLUÇÃO DOS ROTAVIRUS DA ESPÉCIE A**

Um dos aspectos mais observados nos estudos de diversidade genética entre os RVA tem sido o polimorfismo eletroforético exibido pelos segmentos de RNAfd. A diversidade está relacionada a diferentes mecanismos genéticos como as mutações pontuais, rearranjos genéticos, reestruturação de segmentos genômicos (*reassortment*) e recombinação gênica (Estes & Greenberg, 2013).

### **1.5.1. Mutações pontuais**

O acúmulo de mutações pontuais tem sido observado em isolados obtidos em surtos, utilizando as técnicas de sequenciamento de genes de amostras de RVA. Algumas dessas mutações podem ser sinônimas ou silenciosas, não provocando nenhuma mudança na sequência de aa e, conseqüentemente, na proteína; ou podem ser não-sinônimas, podendo

desta forma provocar uma mudança genética que forneça uma vantagem evolutiva para o vírus ou provocando uma perda de função ou estrutura do mesmo. O fato da RNA polimerase RNA dependente não possuir um mecanismo de correção de erros facilita a ocorrência das mutações, que ao se acumularem no genoma podendo definir novas linhagens e sublinhagens dentro de um mesmo genótipo (Estes & Greenberg, 2013).

### **1.5.2. Rearranjos genéticos**

Os rearranjos resultam de erros de transcrição de um único segmento e possuem nada mais do que a sequência de um gene. Na maioria das vezes os genomas com rearranjos surgem como produtos de uma duplicação parcial da ORF do genoma, com variadas consequências relativas à sua expressão. No momento da transcrição, provavelmente por uma falha da RNA polimerase RNA dependente, a mesma retorne à sua fita molde, reiniciando a transcrição a partir de diferentes estágios (Figura 3). As regiões codificantes são mantidas em todos os rearranjos observados, apesar de alguns destes produzirem proteínas de tamanho anormal. Os vírus com segmentos de genoma rearranjados são geneticamente estáveis e reestruturam seus segmentos em infecções mistas. Este tipo de rearranjo pode ocorrer na maioria dos segmentos (Desselberger, 1996).

Os rearranjos genéticos são representados por alterações nas sequências dos segmentos genômicos, algumas vezes na forma de deleção ou mais frequentemente como duplicação. Este evento caracteriza-se pela alteração no perfil de migração dos segmentos de RVA no gel de EGPA (Taniguchi & Urasawa, 1995). Pedley e colaboradores (1984) investigaram RVA isolados de crianças imunodeficientes e observaram variações na mobilidade dos segmentos do RNAfd pela EGPA. Posteriormente, foram descritos eventos de rearranjo genético entre amostras de RVA em animais e crianças (Desselberger, 1996).

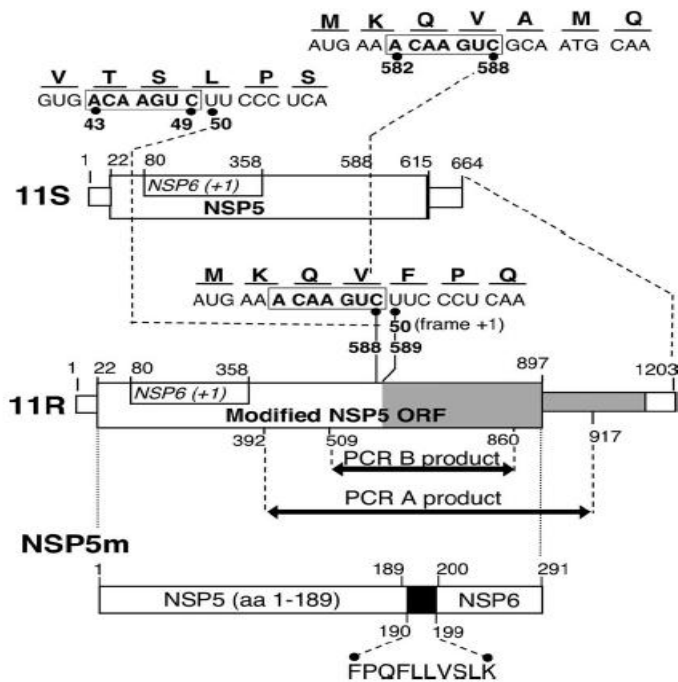


Figura 3 - Padrão de rearranjo do segmento 11 na amostra S141. Adaptado de Schnepf e colaboradores (2008). Legenda: ORF: Fase aberta de leitura.

### 1.5.3. Reestruturação de segmentos genômicos (*reassortments*)

Nas reestruturações de segmentos genômicos (*reassortments*) ocorre uma troca de material genético entre dois vírus similares durante infecções mistas (Figura 4). No caso dos RVA, esta troca ocorre entre dois ou mais segmentos genômicos de duas cepas (humana-humana, humana-animal ou animal-animal) gerando uma progênie com segmentos provenientes das duas cepas de origem. Os *reassortments* foram descritos por Matsuno e colaboradores (1980), através da análise de uma co-infecção em cultura celular de RVA bovino (Lincoln) e RVA símio (SA-11). Através de comparações eletroforéticas dos segmentos de RNAfd do clone com os parentais, observou-se que o genoma reestruturado apresentava os segmentos 4, 5 e 10 de SA-11 e segmentos 1, 2, 3, 6 e 11 de bovino, porém não foi possível determinar a origem dos segmentos 7, 8, e 9 (Matsuno *et al.*, 1980).

As reestruturações *in natura* que resultam em variantes não usuais, têm sido descritas (Mascarenhas *et al.*, 1989; Krishnam *et al.*, 1994), bem como em isolados com especificidade animal, sendo encontrados em outras espécies (Nakagomi & Nakagomi, 1991; Beards *et al.*, 1992; Taniguchi *et al.*, 1994; Palombo & Bishop, 1995; Alfieri *et al.*, 1996; Timenetsky *et al.*, 1997). Porém, esses isolados parecem ser mais frequentes nos países em desenvolvimento, provavelmente facilitados pelas precárias condições de saneamento básico e higiene, defesas

imunológicas limitadas, parasitas, desnutrição, além do estreito relacionamento entre o homem e animais, proporcionando, assim, infecções mistas e conseqüentemente, maiores possibilidade de ocorrer as reestruturações genéticas (Cook *et al.*, 2004).

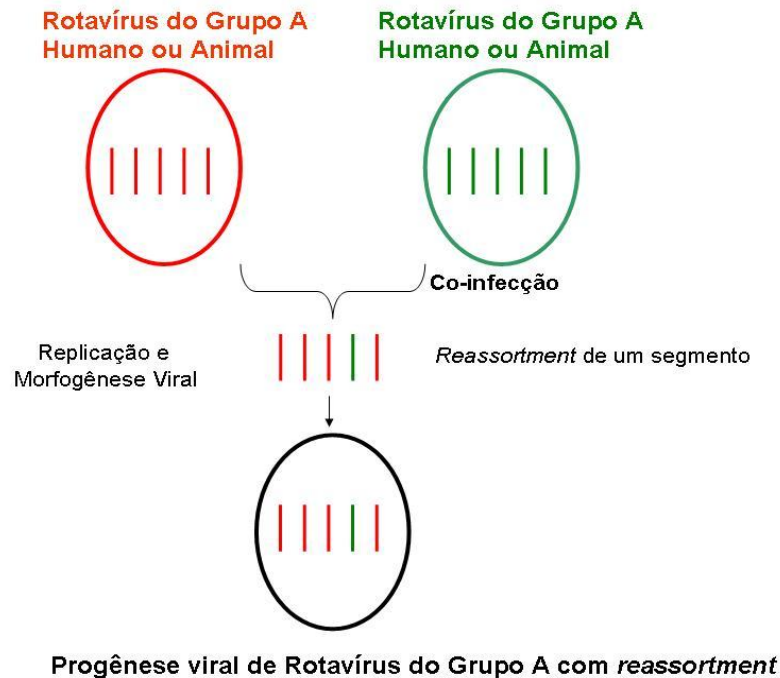


Figura 4 - Esquema representativo do evento de *reassortment* em rotavírus da espécie A.

#### 1.5.4. Recombinação genética

A recombinação genética tem sido descrita como um importante mecanismo de geração de variabilidade genética e evolução dos vírus, ainda que sejam poucos os relatos registrando o acontecimento de eventos de recombinação genética em RVA (Worobey *et al.*, 1999). Além disto, vários estudos descrevem a ocorrência de infecções mistas com amostras de diferentes genótipos de RVA ou com diferentes linhagens de um mesmo genótipo, ocorrendo em um mesmo indivíduo, aumentando, desta forma, as probabilidades de ocorrência de eventos de *reassortment* e/ou recombinação genética (Gouvea *et al.*, 1995; Jain *et al.*, 2001), Figura 5. Porém, o evento de recombinação genética em RVA ainda é pouco conhecido e mais estudos deverão ser realizados para que melhor se entenda a dinâmica da recombinação genética e sua atuação sobre o hospedeiro (Phan *et al.*, 2007).



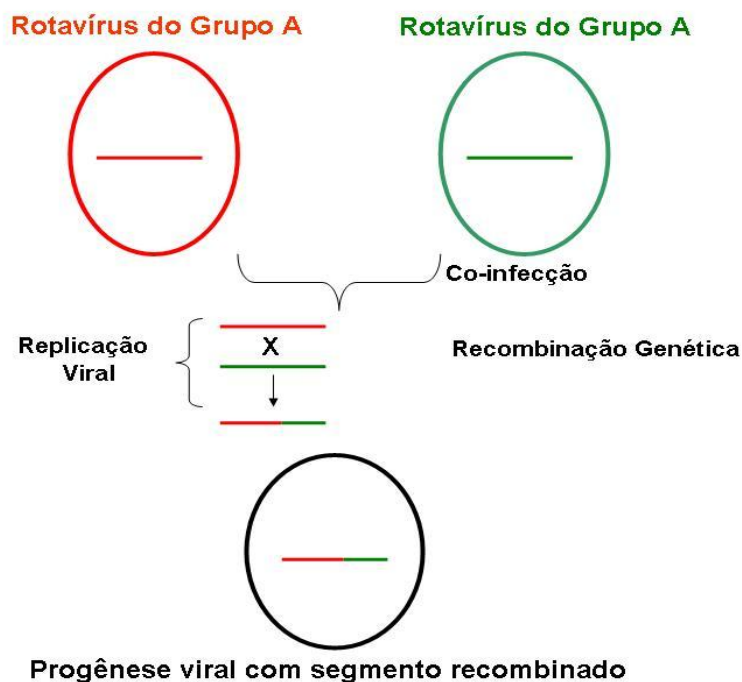


Figura 5- Esquema representativo do evento de recombinação genética de rotavírus da espécie A.

### 1.5.5. Transmissão interespecíes de rotavírus da espécie A

A ocorrência de transmissão de RVA animal para humanos e vice-versa é mais descrita nos países em desenvolvimento, onde pode ocorrer um contato mais estreito entre humanos e animais, principalmente os domésticos, além da carência de saneamento básico e da precariedade sistema de saúde pública (Jain *et al.*, 2001).

Vários segmentos genômicos dos RVA parecem ser potenciais determinantes de restrição ao hospedeiro e virulência destes vírus. Contudo, o entendimento dos processos de base molecular a respeito da restrição das espécies e sobre a virulência dos RVA estão sendo elucidados, através dos dados obtidos pelo sequenciamento completo do genoma de amostras de RVA (Heiman *et al.*, 2008; Matthijssens *et al.*, 2008; Tsugawa *et al.* 2008; Komoto *et al.*, 2013).

## 1.6. REPLICAÇÃO VIRAL

O ciclo replicativo dos RVA inicia-se com a adsorção da partícula viral completa (TLP) à membrana plasmática da célula hospedeira. O processo de adsorção dos RVA é complexo, envolve diferentes proteínas e ainda não foi completamente elucidado. Sabe-se que é dependente de íons sódio ( $\text{Na}^+$ ), que pode ocorrer entre pH 5,5 e 8,0 e a baixas temperaturas ( $4^\circ\text{C}$ ). Ainda, sabe-se da existência de mais de um receptor de membrana envolvido no processo, sendo um localizado na região apical da célula hospedeira e dependente de ácido siálico e o outro localizado na região basolateral da célula e independente de ácido siálico. Em células MA-104 o processo de adsorção dura de 10-12 horas à temperatura de  $37^\circ\text{C}$  (Ramig, 2004; Guerrero & Moreno, 2012; Estes & Greenberg, 2013).

A adsorção ocorre pela ligação entre as espículas virais do capsídeo externo (VP4) e receptores específicos presentes na membrana plasmática da célula alvo. Durante o processo de adsorção, a proteína VP4 é clivada em VP5\* e VP8\* pela ação da tripsina pancreática. A ligação da proteína VP5\* a receptores de membrana é independente de ácido siálico. A proteína VP7 também parece estar envolvida no processo de adsorção, sendo ácido-siálico dependente. Já foi demonstrado que a VP7 se liga à proteína do choque térmico cognato 70 (HSC70) e as integrinas (Ramig, 2004; Guerrero & Moreno, 2012; Trask *et al.*, 2012; Estes & Greenberg, 2013), Figura 6.

A penetração viral pode ocorrer por penetração direta e endocitose (indireta). Na penetração direta, ocorre a perda do capsídeo externo após a adsorção e a DLP entra no citoplasma como resultado da clivagem da VP4 em VP5\* e VP8\*, a qual altera a permeabilidade da membrana plasmática, associado à ação de enzimas proteolíticas (Estes & Greenberg, 2013). Outros estudos demonstram que na penetração direta a baixa concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  seja a responsável pelo desnudamento da partícula, liberando a DLP no citoplasma (Chemello *et al.*, 2002; Pando *et al.*, 2002; Ruiz *et al.*, 2009; Trask *et al.*, 2012).

Na endocitose não ocorre a ação das enzimas proteolíticas e o TLP permanece aprisionado dentro do endossomo. O endossomo se funde a lisossomos e, aparentemente, não ocorre a replicação viral, mas sim, a degradação do RVA. Esta observação sugere que não há desenvolvimento de infecção produtiva quando a penetração ocorre por endocitose. É sugerido que a baixa concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  dentro das vesículas endocíticas solubilize as

proteínas do capsídeo externo e promovam a lise da mesma, liberando a DLP no citoplasma (Venkataram *et al.*, 2001; Estes & Greenberg, 2013), Figura 6.

Uma vez liberada no citoplasma, a DLP inicia o processo de replicação viral ativando o complexo interno da polimerase (VP1 e VP3) e os RNA(+) capeados são transcritos. Estes RNA(+) servem tanto como RNAm na síntese das proteínas virais assim como moldes para produzir RNA(-) durante a replicação viral. As proteínas sintetizadas e o RNAs viral são reunidos no citoplasma da célula infectada, constituindo um material amorfo denominado viroplasma. O empacotamento do genoma se inicia quando a VP1 une-se ao extremo 3' do RNA(+) viral. A proteína VP6 reconhece o core sintetizado formando as *DLP*. A NSP4 possui domínio citoplasmático que ancora as *DLP*, por intermédio de VP6 e VP4, propiciando o brotamento das *DLP* para o interior do RE. Pouco depois ocorre a montagem das partículas com capsídeo externo, resultando em partículas virais maduras com diâmetro aproximado de 100 nm. Após a liberação do vírion da célula, as proteases do trato gastrointestinal clivam a proteína VP4 em VP8\* e VP5\*, o que finalmente resulta no vírion completo infeccioso (McDonald & Patton, 2011; Estes & Greenberg, 2013), Figura 8. Estudos *in vitro* indicaram que o RVA pode sair da célula através de lise da célula ou através da utilização de uma via secretora (Musalem & Espejo, 1985; Jourdan *et al.*, 1997; Trask *et al.*, 2012).

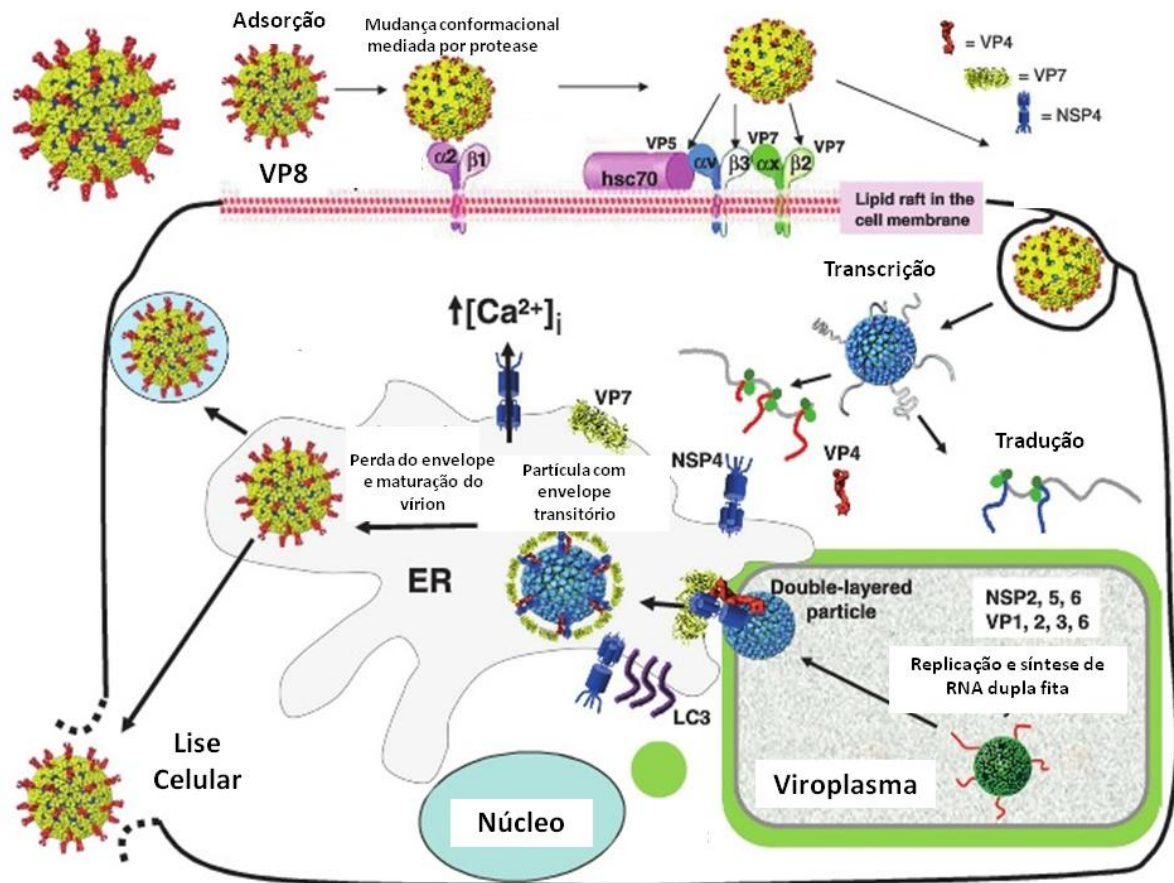


Figura 6- Esquema da biossíntese dos rotavírus da espécie A. Adaptada de Estes & Greenberg, 2013. Legenda: ER- Retículo Endoplasmático;  $Ca^{2+}$ - íon cálcio; LC3- marcador autofagossomal.

### 1.7. RESPOSTA IMUNE HUMANA CONTRA ROTAVIRUS DA ESPECIE A

Os RVA são reconhecidos pelas células do sistema imune, as quais evocam a cascata de eventos que conduzem a ativação de fatores de transcrição, do fator regulatório de INF 3 e do fator nuclear NF- $\kappa$ B. Esses fatores, por sua vez, induzem a liberação de INF tipo I (INF-a e INF-b) (Wilkins & Gale, 2010; López & Arias, 2012). Diferentes estratégias utilizadas pelo RVA para evadir à resposta imune celular, a qual parece ser específica para cada tipo de cepa de RVA e tipo celular já foram descritos (López & Arias, 2012).

O RNAdf parece ser o mediador principal envolvido na indução de INF em resposta à infecção viral. Sensores celulares detectam a presença do RNAdf e ativam uma cascata de

eventos que promovem a inibição da síntese de proteínas celulares, a transcrição dos genes que codificam para INF e citocinas, induzindo a morte celular (Rehwinkel, Reis & Sousa, 2010; López & Arias, 2012).

A infecção natural por RVA confere proteção clínica significativa durante uma reinfecção (Linhares & Bresee, 2000; Angel *et al.*, 2012). Estudos de coorte conduzidos no México e em Guiné-Bissau mostraram que episódios recorrentes de infecção por RVA são significativamente mais brandos que a primo-infecção (Velazquez *et al.*, 1996; Fischer *et al.*, 2002). Entretanto, essa proteção pode ser de curta duração, incompleta (Bishop *et al.*, 1983) ou idade-dependente (Ward *et al.*, 2006). Um estudo recente realizado na Índia demonstrou que a gravidade da diarreia por RVA não diminuiu de forma significativa entre a primeira e a segunda infecção; mas sim, entre a segunda e a terceira infecção (Gladstone *et al.*, 2011). Considerando-se que a capacidade de produção de anticorpos é idade-dependente, uma infecção primária por RVA tão precoce pode não induzir de forma eficiente a resposta protetora do sistema imune e, conseqüentemente, diminuir a eficácia da infecção natural em induzir altos níveis de anticorpos protetores (Ward *et al.*, 2006; Angel *et al.*, 2012).

Os dados obtidos através de estudos com adultos voluntários, infecções naturais e ensaios vacinais indicam que a presença de anticorpos séricos pode ser considerada um bom marcador de proteção. Contudo, o papel dos anticorpos intestinais, considerando que o sítio de replicação dos RVA é o intestino delgado, na proteção da infecção ainda não foi demonstrado de forma consistente, devido à dificuldade de coleta de fluídos entéricos de crianças com diarreia, à instabilidade dos anticorpos no intestino e à variação na sensibilidade dos métodos de detecção utilizados. Os níveis das células *natural killers* (NK), linfócitos T citotóxicos (CTL) e citocinas, as quais podem exercer efeitos reais na proteção contra a infecção por RVA, são muito difíceis de serem mensurados (Jiang *et al.*, 2002).

Tanto infecções primárias quanto secundárias causadas por RVA são capazes de promover a produção de anticorpos das classes IgG, IgM e IgA no soro, saliva e secreções intestinais (Richardson & Bishop, 1990; Bhan *et al.*, 1993). A VP6 é reconhecidamente a proteína mais imunogênica, estimulando a produção de IgA, principalmente, na mucosa do intestino delgado (Burns *et al.*, 1996). A presença de IgA contra a VP6 em secreções reflete a habilidade de neutralização viral pelo hospedeiro e, conseqüentemente, imunidade de mucosa e resistência a reinfecção (Molyneaux, 1995).

As proteínas VP7 e VP4 também são capazes de estimular a produção de anticorpos séricos neutralizantes, conferindo proteção sorotipo-específico (homotípica) aos hospedeiros (Offit *et al.*, 1986; Hoshino *et al.*, 1988; Ward *et al.*, 1996). Embora a resposta imunológica clássica dos RVA seja homotípica também existe uma resposta heterotípica uma vez que RVA de genótipos distintos reservam entre si proteínas idênticas e reagem de forma cruzada com os múltiplos sorotipos (Jiang *et al.*, 2002; Ward *et al.*, 2008).

O desenvolvimento da imunidade homotípica versus a heterotípica após a infecção natural (ou vacinação) é um fenômeno complexo e ainda não foi completamente esclarecido. Diversos estudos relatam a ocorrência de reinfecções pelos mesmos genótipos G ou P. Esses estudos dão suporte a hipótese de que as infecções naturais por RVA realmente produzem uma proteção incompleta (O’Ryan *et al.*, 1994).

Considerando que a presença de anticorpos no intestino delgado no momento de exposição aos RVA é fundamental para a prevenção da infecção, a presença desses anticorpos neutralizantes no colostro ou leite materno também deve ser importante (Molyneaux, 1995). Embora anticorpos sorotipo-específicos tenham sido detectados no leite materno, a função do aleitamento na proteção contra a GA ainda requer estudos adicionais (Estes & Greenberg, 2013).

Infecções por RVA ocorridas nos primeiros meses de vida em lactentes, de forma assintomática, parecem ser explicadas pela passagem de anticorpos maternos passivamente, seja via transplacentaria (IgG), seja por ingestão de leite materno (IgA) (Linhares *et al.*, 1989).

Embora estudos tenham sido realizados visando compreender a resposta imune resultante da infecção por RVA em humanos e animais, os mecanismos que conferem essa proteção ainda não estão totalmente esclarecidos (Linhares & Bresee, 2000).

## **1.8. PATOGENESE**

Os RVA são altamente infecciosos e adaptados ao hospedeiro, podendo infectar igualmente o homem e animais (Franco *et al.*, 2006). A transmissão deste vírus é feita pela via fecal-oral. Após um período de incubação que varia entre 2 e 4 dias, os sintomas geralmente

começam abruptamente com febre e vômitos, seguidos de diarreia aquosa que pode durar de 3 a 8 dias (Staat *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2008).

A doença provocada pelos RVA é mais frequente em crianças entre 3 e 36 meses de idade, e acredita-se que múltiplas infecções ocorram ao longo da vida e que por causa da imunidade adquirida nestes episódios, as crianças com idade mais avançada e os adultos sofram com episódios menos graves e/ou assintomáticos (Anderson & Weber, 2004).

Os RVA se replicam no epitélio do intestino delgado, mais especificamente nos enterócitos maduros, com função digestiva e absorptiva, que recobrem o topo das microvilosidades da mucosa duodenal (Estes & Greenberg, 2013). A diarreia causada pelos RVA é multifatorial e, portanto, diversos mecanismos estão envolvidos (Quadro 2).

Mecanismos	Comentários
A ação da toxina NSP4 induz diarreia secretória	Só demonstrado em camundongos; ocorre durante o início da infecção, antes da morte celular
Estimulação do sistema nervoso entérico (SNE) induz diarreia secretória e aumenta a motilidade intestinal	Drogas que inibem o SNE são efetivas para tratar a diarreia causada pelos RVA; ocorre durante o início da infecção, antes da morte celular
A alteração no metabolismo das dissacaridases e outras proteínas de membrana dos enterócitos induz a diarreia osmótica e mal absorptiva	Ocorre durante o início da infecção, antes da morte celular
A morte dos enterócitos contribui para a ocorrência da diarreia osmótica e mal absorptiva	Mecanismos tardios

Quadro 2. Resumo apresentando os mecanismos envolvidos na geração de diarreia pelos rotavírus da espécie A. Adaptado de Franco e colaboradores (2006).

Após a internalização do vírus na célula, eventos intracelulares causam a liberação de  $Ca^{2+}$  do RE desencadeando uma série de processos celulares, incluindo a disjunção do citoesqueleto, a diminuição da expressão de dissacaridases e outras enzimas presentes na superfície apical, a inibição do sistema de co-transporte de íons  $Na^+$  e necrose. Estes eventos levam a dificuldade na absorção através da diminuição na capacidade absorptiva do epitélio

(Ramig, 2004). Um fragmento da proteína NSP4 é secretado da célula e é capaz de induzir o aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular em células vizinhas amplificando o efeito da infecção causada pelo vírus (Zhang *et al.*, 2000; Tafazoli *et al.*, 2001).

As alterações histopatológicas, primariamente localizadas no intestino delgado, caracterizam-se por lesões visíveis a microscopia óptica e de gravidade variável, desde a vacuolização do enterócito até o grave comprometimento do epitélio com atrofia das vilosidades e hiperplasia das criptas (Estes & Greenberg, 2013). Na maioria dos casos não existe correlação entre a gravidade clínica e as alterações histopatológicas encontradas, o que sugere o envolvimento de diferentes mecanismos nos mecanismos das diarreias associadas ao RVA, acreditando-se na participação de componentes determinantes de má-absorção e outros secretores (Widdowson *et al.*, 2005; Greenberg e Estes, 2009).

O sistema nervoso entérico (SNE) se localiza imediatamente abaixo do epitélio das vilosidades, e está localizado para receber estímulos do epitélio danificado pela infecção por rotavírus. Lundgren e colaboradores (2000) demonstraram que o SNE está envolvido na diarreia causada pelos RVA. Posteriormente foi demonstrado que a ativação de SNE ocorre pela liberação de prostaglandinas, serotonina (5-HT), peptídeos sinalizadores, citocinas e da enterotoxina viral NSP4, ocasionando o aumento da motilidade intestinal (Boshuizen *et al.*, 2004; Hagbom *et al.*, 2011).

## **1.9. TRATAMENTO E PREVENÇÃO**

Dentre as medidas gerais indicadas para a prevenção e controle da GA de qualquer etiologia destacam-se o incentivo ao aleitamento materno precoce e exclusivo até o sexto mês de vida, a lavagem das mãos, o consumo de água tratada, o acesso ao saneamento básico e a oferta de tratamento adequado para as crianças acometidas (WHO, 2013).

O tratamento da diarreia causada pelos RVA tem como base repor as perdas de fluidos e eletrólitos. Para a reidratação da criança pode-se utilizar a fórmula preconizada pela OMS ou ainda outra fórmula comercial disponível. Estas fórmulas tem se mostrado efetivas para crianças com desidratação moderada (Bernstein, 2009).

Nos casos de diarreia grave é recomendável a utilização de fluidos intravenosos, ou no caso de que a criança tenha dificuldade de deglutição devido à intensidade dos vômitos. A



terapia nutricional e a assistência médica são extremamente importantes, ajudando a reduzir a morbimortalidade causada pelos RVA.

Não existem medicamentos antivirais disponíveis para o tratamento da infecção pelos RVA, entretanto, diversos estudos demonstram a atividade antiviral de algumas drogas frente a estes vírus (Rossignol *et al.*, 2006; Teran *et al.*, 2009; La Frazia *et al.*, 2013; Shen *et al.*, 2013).

A nitazoxanida, agente utilizado no tratamento de helmintos e protozoários, vem sendo testada para um possível uso terapêutico em caso de GA causada por RVA em crianças (Dennehy, 2013). Doses de 15 mg/kg/dia duas vezes ao dia, durante três dias, reduziu significativamente a duração da diarreia e o tempo de hospitalização em crianças com GA causada por RVA (Rossignol *et al.*, 2006). No entanto, a aplicação na prática clínica diária deverá ser avaliada criteriosamente, ainda não sendo este agente recomendado para o tratamento das diarreias causadas por RVA.

O uso de vacinas efetivas, capazes de proteger a criança particularmente contra as formas moderadas e graves da GA por RVA, representa a principal estratégia para a redução da morbimortalidade associada a esse vírus (Atherly *et al.*, 2012). Algumas vacinas já foram desenvolvidas ou estão em desenvolvimento, entretanto, somente duas Rotarix<sup>®</sup> (RV1) e Rotateq<sup>®</sup> (RV5) estão licenciadas para uso em vários países, incluindo o Brasil (O’Ryan *et al.*, 2011). No quadro 3 estão apresentadas as vacinas RVA em desenvolvimento/ licenciadas mundialmente.

Vacina	Conceito e formulação	Sorotipo[Genótipo]	Fabricante	Status
LLR	Monovalent like oral lamb LLR strain	G10P[12]	Lanzhou Institute of Biological Products (China)	Licenciada (China)
Rotarix (RV1)	Oral, monovalente, cepa humana (89-12)	G1P[8]	GlaxoSmithKline (Bélgica)	Licenciada
RotaTeq (RV5)	Oral, pentavalente, <i>reassortant</i> humano-bovino (WC3)	G1, G2, G3, G4, P[8]	Merck (EUA)	Licenciada
UK-recombinante	Oral, hexavalente, <i>reassortant</i> humano-bovino (UK)	G1, G2, G3, G4, G8, G9	NIH (EUA)	Fase I (Brasil, Índia e China)
RV3	Oral, monovalente, cepa humana (RV3)	G3P[6]	DynCorp (EUA)	Fase I-II
116E	Oral, monovalente, cepa humana (116E)	G9P[11]	Bharat Biotech (Índia)	Fase III
I321	Oral, monovalente, cepa humana (I321)	G10P[11]	Bharat Biotech (Índia)	Fase III
BIRVI	Oral, monovalente, cepa humana (AU64)	G1P[4]	Biken (Japão)	Em desenvolvimento

Quadro 3. Vacinas rotavírus da espécie A em desenvolvimento e/ou licenciadas no mundo. Adaptado de Yen e colaboradores (2011).

A vacina RV1 é atenuada de origem humana, monovalente de especificidade G1P[8] derivada da amostra 89-12 e de uso oral (Cheuvert *et al.*, 2009). Os estudos de fases II e III realizados na América Latina, incluindo o Brasil, envolveram aproximadamente 100.000 crianças e demonstraram níveis protetores médios de 85% contra a GA grave e hospitalizações por RVA. A vacina também apresentou elevada eficácia em prevenir GA de qualquer gravidade causada pelo genótipo G1 (92%) e os genótipos G3, G4 e G9 (88%). No que se refere a internações devido a GA de qualquer etiologia, evidenciou-se proteção de 42% (Ruiz-Palacios *et al.*, 2006). No Brasil, a RV1 denominada Vacina Oral de Rotavírus Humano (VORH) foi introduzida no PNI em março de 2006 no Brasil. É administrada em duas doses, a primeira a partir de 1 mês e 15 dias até 3 meses e 7 dias, e a segunda dose de 3 meses e 7 dias até 5 meses e 15 dias, respeitando-se as faixas etárias preconizadas (Ministério da Saúde, 2006).

No Brasil, reduções nas admissões hospitalares relacionadas à GA foram significativas tanto nas regiões mais desenvolvidas (Sul e Sudeste), bem como nas regiões mais pobres do Brasil (Norte e Nordeste), onde os indicadores socioeconômicos e de saúde se aproximem àquelas dos países menos desenvolvidos (do Carmo *et al.* 2011; Carvalho-Costa *et al.*, em preparação).

Estudos realizados na América Latina e Europa apresentam evidências de que um esquema vacinal incompleto (uma dose apenas) confere proteção de 89,8% e 62,5%, respectivamente, apesar de ocorrer em níveis inferiores a observada em crianças que receberam o esquema vacinal completo (Lopez *et al.*, 2006; Vesikari *et al.*, 2006). Também na Europa, um estudo envolvendo o acompanhamento de gêmeos na mesma família detectou a cepa vacinal em pelo menos um espécime fecal entre 18,8% daqueles que receberam placebo, sugerindo transmissão horizontal decorrente da imunização em larga escala com a vacina RV1 (Rivera *et al.*, 2011).

A vacina RV5 é constituída por cepas de RVA geneticamente reestruturadas, de origem humana e bovina, contendo em quatro delas a expressão das proteínas VP7 (G1, G2, G3, G4) em combinação com a VP4 (P[8]), assumindo composição final pentavalente. Ela é administrada em três doses, aos 2, 4 e 6 meses, sendo a primeira entre 6-12 semanas e as subsequentes a intervalos de 4-10 semanas, completando-se o esquema até o máximo de 32 semanas (Yen *et al.*, 2011; WHO, 2013). Um estudo voltado a eficácia da vacina RV5 evidenciou índices protetores de 74% contra GA em geral e 96% e 93%, se considerados os atendimentos ambulatoriais e as hospitalizações, respectivamente (Vesikari *et al.*, 2006). Um estudo realizado com cepas de crianças brasileiras provenientes das regiões Centro-Oeste (Goiás), Nordeste (Bahia), Sudeste (São Paulo) e Sul (Porto Alegre) demonstrou que a RV5 reduziu 93% do número de internações de crianças por GA causada

por RVA, com uma redução anual de hospitalizações estimada entre 42.991 e 77.383, nas quatro regiões combinadas (El Khoury *et al.*, 2011).

O impacto que o uso generalizado de vacinas RVA poderá ter sobre a diversidade e evolução dos RVA humanos ainda não está totalmente esclarecido uma vez que a maioria dos programas de vacinação foi recentemente estabelecida (Patel *et al.*, 2011; Kirkwood, 2010). No entanto, estudos pós-vacinais revelaram a excreção e a transmissão de cepas vacinais em crianças vacinadas e não vacinadas (Payne *et al.*, 2011; Bucardo *et al.*, 2012; Donato *et al.*, 2012).

No Brasil, um estudo realizado após a introdução da vacinação em massa com a RV1 demonstrou a ocorrência de *reassortment* entre cepa selvagem e a vacina em crianças vacinadas e não vacinadas (Rose *et al.*, 2013). O mesmo estudo demonstrou a presença de um segmento genômico vacinal em uma criança não vacinada, sugerindo a capacidade de imunização coletiva da vacinação por RV1 no Brasil. Portanto, essas constatações sugerem que os segmentos genômicos dos vírus da vacina podem ser introduzidos nos vírus humanos em circulação através de *reassortment*. Todos estes dados indicam que a pressão seletiva proveniente das vacinas pode ser sutil, podendo levar anos para se tornar aparente justificando a necessidade de uma vigilância longitudinal.

## **1.10. EPIDEMIOLOGIA DOS ROTAVIRUS DA ESPECIE A**

A distribuição dos genótipos de RVA varia espacial e temporalmente e múltiplos genótipos G e P podem cocircular na população, inclusive dentro da mesma região geográfica. Com relação à sazonalidade, é possível observar um padrão apenas nas regiões de clima temperado, com surtos e epidemias nos meses mais frios e secos do ano. Em geral, nas regiões de clima tropical as infecções por RVA ocorrem ao longo de todo o ano (Estes & Greenberg, 2013). A maioria dos estudos epidemiológicos tem demonstrado que amostras de RVA de genótipos G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8] e G9P[8] são responsáveis pela maioria das infecções em humanos (92%), sendo importantes alvos de estudos para o desenvolvimento de vacinas (Kirkwood, 2010). Apesar do genótipo G1P[8] ser o mais prevalente mundialmente, sendo responsável por mais de 70% das infecções por RVA na América do Norte, Europa e Austrália, este genótipo representa somente 30% das infecções por RVA na América do Sul e Ásia e 23% na África (Tate *et al.*, 2010).

Nos países desenvolvidos, as cepas de genótipos G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8] e G9P[8] (mais comuns mundialmente) são detectadas em aproximadamente 100% das infecções causadas por RVA. Nos países em desenvolvimento, além das cepas comumente detectadas, combinações incomuns de RVA (geralmente devido ao evento de *reassortment* com cepas animais) também são detectadas e exibem ampla variação de uma região para outra. Um programa de vigilância conduzido pela WHO em 2010 evidenciou que as cepas incomuns predominantes eram: G12P[8] e G12P[6] no sudeste asiático; G2P[6], G3P[6] e G1P[6] na África Sub-Saariana; G1P[4] e G2P[8] no Pacífico Oeste e; G9P[4] nas Américas (WHO, 2011; Patton, 2012).

No Brasil estes genótipos representam 75% dos RVA detectados (Carvalho-Costa *et al.*, manuscrito em preparação). Os genótipos G1-G4 e G9 foram os mais prevalentes nas últimas 3 décadas. O genótipo G5, comumente descrito em suínos, foi primeiramente detectado em humanos no Brasil por Gouvea *et al.* (1994) e considerado endêmico nas décadas de 1980 e início de 1990, sendo substituído pelo genótipo G9 que emergiu mundialmente na década de 1990 e rapidamente tornou-se um dos cinco genótipos de RVA mais prevalentes (Rahman *et al.*, 2005; Matthijssens *et al.*, 2010). Um surto de GA no estado do Acre no ano de 2005 foi atribuído ao RVA de genótipo G9P[8], sendo descritas 12,145 hospitalizações e oito mortes na municipalidade de Rio Branco (Siqueira *et al.*, 2010). Análises filogenéticas de amostras detectadas neste surto revelaram a circulação de uma nova variante do genótipo G9P[8] que até o momento só tem sido descrita no Brasil (Tort *et al.*, 2010). Na Argentina, este genótipo foi o mais prevalente entre 2006-2008, sendo que em 2009 a detecção deste genótipo teve uma drástica redução e concomitantemente ocorreu o aumento dos genótipos G3P[8] e G12P[8] (Stupka *et al.*, 2009).

Em 2005 o genótipo G2P[4] reemergiu e tornou-se o genótipo mais prevalente no Brasil no período de 2006 a 2011 (Figura 7) (Leite *et al.*, 2008; Linhares *et al.*, 2011; Carvalho-Costa *et al.*, 2011; Carvalho-Costa *et al.*, manuscrito em preparação). No período de 2006 a 2007, primeiro ano de implementação da vacina RV1, G2 foi detectado nos estados do Rio de Janeiro, Sergipe, Pernambuco, Piauí e Minas Gerais (Leite *et al.*, 2008). Na região Nordeste do Brasil, diferentes estudos mostraram uma prevalência de 100% para o genótipo G2P[4] no ano de 2007 (Gurgel *et al.*, 2007, Nakagomi *et al.*, 2008). Estudos realizados na região Norte do Brasil demonstraram que a re-emergência de G2 alcançou taxas de até 90% (de Oliveira *et al.*, 2008). Deve-se destacar que no Sul do país o genótipo mais prevalente em 2009 foi o G3P[8]. Dados recentes demonstram que em 2012 o genótipo G2P[4] deixou de ser o mais prevalente no Brasil e observou-se um aumento na prevalência dos genótipos G3P[8]/G3P[X] e G9P[8]/G9P[X] (Carvalho-Costa *et al.*, manuscrito em preparação).

Recentemente, outros genótipos estão sendo descritos e considerados como emergentes epidemiologicamente no mundo. Este é o caso de G5, em países da África e da Ásia; assim como G8, G10 e G12 mundialmente (Matthijnsens *et al.*, 2010; Iturriza-Gómara *et al.*, 2011). No Brasil os genótipos G2P[8]; G3P[4]; G4P[6]/P[9]; G5P[6]/P[8]/G5P[NT]; G8P[4]/P[8]; G9P[4]/P[6]; G10P[9]; G12P[9]/P[8]/P[6] e G6 tem sido detectados esporadicamente (Araújo *et al.*, 2001; Mascarenhas *et al.*, 2002; Pietruchinski *et al.*, 2006; Domingues *et al.*, 2008; Leite *et al.*, 2008; Soares *et al.*, 2011; Gómez *et al.*, 2013; Gómez *et al.*, 2014).

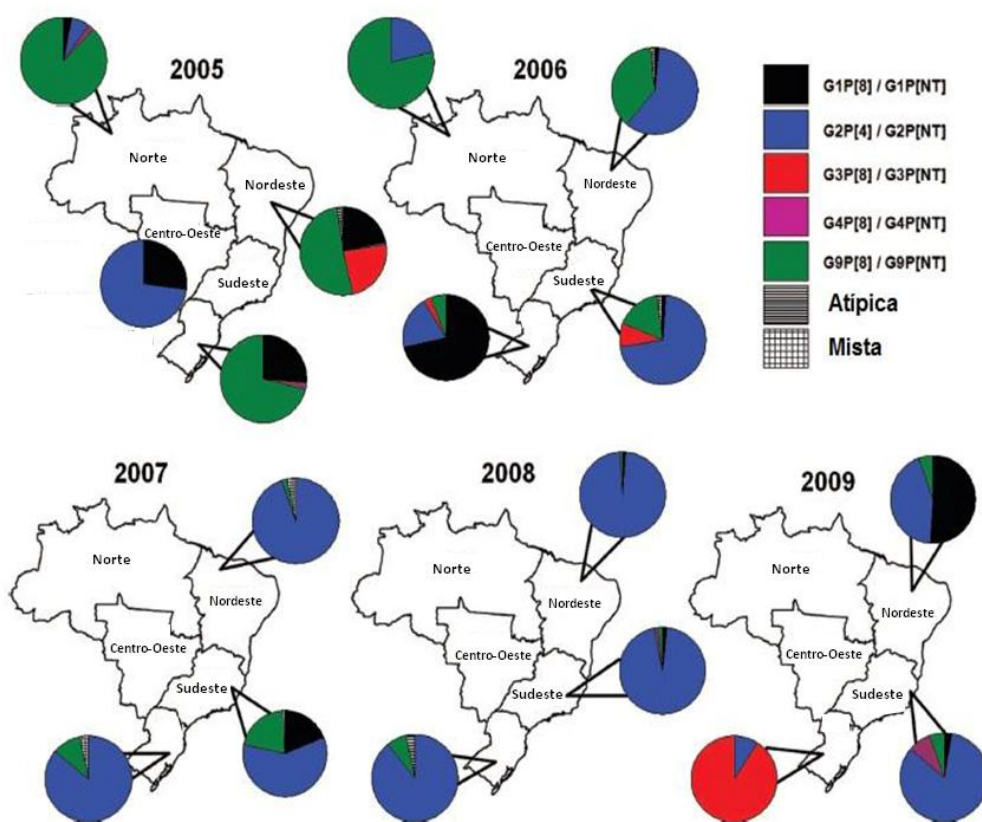


Figura 7- Distribuição dos genótipos de rotavírus da espécie A no Brasil entre 2005 e 2009. Figura adaptada de Carvalho-Costa *et al.*, 2011.

## 2. JUSTIFICATIVA

Apesar dos mecanismos relacionados tanto com a diversidade de hospedeiros quanto evolutivos propiciarem o surgimento de novos genótipos de RVA, a maioria dos estudos epidemiológicos tem demonstrado que cepas de genótipos G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8] e G9P[8] são responsáveis pela maioria das infecções em humanos. No Brasil, estes genótipos representam aproximadamente 75% das cepas de RVA descritas (Leite *et al.*, 2008, Linhares & Justino, 2014; Carvalho-Costa *et al.*, manuscrito em preparação).

A genotipagem de cepas de RVA circulantes no país em dois períodos pré-vacinais compreendidos entre 1982-1995 e 1996-2005, demonstram que as combinações mais frequentemente encontradas foram: G1P[8]/G1P[?], G9P[8]/ G9P[?], G2P[4]/ G2P[?], G3P[8]/ G3P[?], G4P[8]/ G4P[?] e G5P[8]/ G5P[?] (Leite *et al.*, 2008).

No Brasil, o genótipo G5, comumente descrito em suínos, foi primeiramente detectado em humanos no Brasil por Gouvea *et al.* (1994) e considerado endêmico nas décadas de 1980 e início de 1990, sendo substituído pelo genótipo G9 que emergiu mundialmente na década de 1990 (Kapikian *et al.*, 2001, Gentsch *et al.*, 2005; Leite *et al.*, 2008). Este genótipo foi descrito mais recentemente infectando humanos em outros países: Camarões (Esona *et al.*, 2009), Bangladesh (Hashizume *et al.*, 2008), Bulgária (Mladenova *et al.*, 2012), China (Duan *et al.*, 2007), Japão (Komoto *et al.*, 2013), Taiwan (Wu *et al.*, 2011), Vietnã (Ahmed *et al.*, 2007) e novamente no Brasil (Carvalho-Costa *et al.* 2007).

Dentre os genótipos mais detectados mundialmente, o G1 é o responsável por aproximadamente 50% de todas as infecções por RVA, tendo sido identificado em todos os continentes nas últimas décadas (Gentsch *et al.*, 2005; Santos & Hoshino, 2005; Parashar *et al.*, 2006; Barril *et al.*, 2013; Hemming *et al.*, 2013). No Brasil, o genótipo G1 foi descrito como o genótipo predominante em infecções por RVA em crianças desde a década de 1980 até 2006, ano de introdução da vacina RV1 no país e permanece sendo detectado, em menor frequência, entre cepas de RVA coletadas de crianças de diferentes regiões brasileiras (Leite *et al.*, 2008, Gomez *et al.*, 2013, Rose *et al.*, 2003, Carvalho-Costa *et al.*, em preparação).

O Brasil foi o primeiro país a introduzir a vacinação em massa RV1, em março de 2006 (O’Ryan *et al.*, 2011), apresentando o genótipo mais prevalente mundialmente (G1P[8]) em sua composição.

A OMS recomenda o monitoramento da diversidade genética das cepas de RVA circulantes para se identificar a emergência de genótipos, como ocorreu com o genótipo G9 na década de 1990 (Linhares *et al.*, 2011) e recentemente, a emergência de novos genótipos como G8 e G12 foi descrita

em diferentes continentes (Castello *et al.*, 2009; Gomez *et al.*, 2010, *in press*; Hassine-Zaafraane *et al.*, 2011; Sánchez-Fauquier *et al.*, 2011).

Na literatura, a maioria dos estudos está relacionada à caracterização dos genes que codificam para as proteínas VP7, VP8\*, VP6 e NSP4. Embora os dados sobre a diversidade do gene que codifica para a VP7 e/ou VP8\* sejam importantes do ponto de vista da imunidade do hospedeiro contra a doença causada pelo RVA, informações sobre esses genes não seriam suficientes para obter dados conclusivos sobre a dinâmica evolutiva destes vírus, uma vez que a natureza segmentada do genoma dos RVA propicia a ocorrência de uma série de mecanismos geradores de variabilidade genética que podem não ser detectados apenas pela análise dos genes que codificam as proteínas do capsídeo externo.

Neste contexto, visamos analisar os 11 genes (constelação gênica) de cepas de RVA de genótipos G5P[8] e G1P[8] circulantes no Brasil entre 1986 e 2013, antes e após a introdução da vacinação em massa com a RV1 para melhor entender a dinâmica evolutiva deste vírus.

Especificamente, questionamos: As cepas brasileiras de genótipo G5 apresentam constelação genômica mais semelhante às cepas humanas ou suínas? Os genes internos das cepas de genótipo G5 Brasileiras são semelhantes aos apresentados pelas cepas G5 Africanas e Asiáticas detectadas após a década de 2000? A introdução da vacinação massiva pela RV1 exerceu alguma pressão sobre a circulação deste genótipo no país? As cepas G1P[8] circulando após a introdução da vacina RV1 são diferentes das cepas circulantes no período pré-vacinal? Qual mecanismo envolvido no sucesso da permanência do genótipo P[8] em associação com diferentes genótipos G nas últimas três décadas no Brasil, mesmo após a introdução de duas vacinas com este genótipo em suas composições?



### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Geral**

Analisar a constelação gênica de cepas de RVA de genótipos G5P[8] e G1P[8] coletadas entre os anos de 1986 e 2013 no Brasil, pré e pós-introdução da vacina RV1 pelo PNI.

#### **3.2. Específicos**

- Realizar a caracterização molecular e análise filogenética baseada nos genes que codificam para VP1, VP2, VP3, VP8\* e VP7 de cepas de RVA de genótipo G5P[8] circulando no Brasil entre 1986 e 2005 (artigos 1 e 2);
- Realizar a caracterização molecular e análise filogenética baseada nos genes que codificam para VP6, NSP1, NSP2, NSP3, NSP4 e NSP5 de cepas de RVA de genótipo G5P[8] circulando no Brasil entre 1986 e 2005 (apêndice);
- Realizar a caracterização molecular e análise filogenética baseada no gene que codifica para VP8\* de cepas de RVA de genótipo P[8] em associação com diferentes genótipos G circulando no Brasil entre 1986 e 2011 (artigo 3);
- Analisar a constelação gênica de cepas de RVA de genótipo G1P[8] circulando no Brasil antes e após a introdução da vacina RV1 no país (artigo 4).

#### **4. METODOLOGIAS E RESULTADOS**

As metodologias utilizadas e os resultados obtidos neste manuscrito serão apresentados sob a forma de artigos publicados ou em fase de submissão em revistas científicas indexadas.

## **CAPITULO II**

**ANÁLISE FILOGENÉTICA DOS ONZE SEGMENTOS  
GÊNICOS DE CEPAS DE RVA COLETADAS DE CRIANÇAS  
BRASILEIRAS DE GENÓTIPO G5P[8] COLETADAS ENTRE  
1986 E 2005**

**(ARTIGOS 1 E 2)**

1. **Artigo 1:** Gene de VP7 de RVA humano de genótipo G5: análise filogenética revela a existência de três linhagens mundialmente.

**Publicado em:** Journal of medical virology

**Fator de impacto:** 2,373

**Resumo:** Neste estudo foram realizadas análises filogenéticas baseadas nos genes que codificam para VP7 e VP8\* de cepas brasileiras de genótipo G5P[8] circulantes no Brasil entre 1986 e 2005. A análise do gene de VP7 demonstrou a existência de três linhagens de G5: Linhagem I, agrupando cepas brasileiras de origem humana e três cepas suínas coletadas na Tailândia no ano de 2006, a linhagem II, onde agruparam cepas de origem animal coletadas mundialmente e linhagem III, agrupando cepas africanas e asiáticas de origem humana, além de duas cepas argentinas de origem suína. A análise do gene de VP8\* demonstrou que o genótipo G5 circulou no Brasil em associação com três linhagens de P[8]: P[8]-1, P[8]-2 e P[8]-3.

# VP7 Gene of Human Rotavirus A Genotype G5: Phylogenetic Analysis Reveals the Existence of Three Different Lineages Worldwide

Marcelle Figueira Marques da Silva,<sup>1</sup> Luis Fernando López Tort,<sup>1</sup> Mariela Martínez Gómez,<sup>1</sup> Rosane Maria Santos Assis,<sup>1</sup> Eduardo de Mello Volotão,<sup>1</sup> Marcos César Lima de Mendonça,<sup>1</sup> Gonzalo Bello,<sup>2</sup> and José Paulo Gagliardi Leite<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Comparative and Environmental Virology, Oswaldo Cruz Institute—FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

<sup>2</sup>Laboratory of AIDS and Molecular Immunology, Oswaldo Cruz Institute—FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Group A rotavirus (RV-A) genotype G5, which is common in pigs, was also detected in children with severe diarrhea in Brazil, Argentina, Paraguay, Cameroon, China, Thailand, and Vietnam. To evaluate the evolutionary relationship among RV-A G5 strains, the VP7 and VP4 genes of 28 Brazilian RV-A G5 human strains, sampled between 1986 and 2005, were sequenced and compared with other RV-A G5 strains currently circulating worldwide in animals and humans. The phylogenetic analysis of RV-A G5 VP7 gene strains demonstrates the existence of three main lineages: (a) Lineage I: Brazilian strains grouped with three porcine strains from Thailand; (b) Lineage II: porcine, bovine, and equine strains from different regions; (c) Lineage III: human strains isolated in Asia and Africa, and two porcine strains from Argentina. The VP8\* (\*non-typable) subunit of VP4 gene sequencing showed that all P[8] strains fell into three major genetic lineages: P[8]-1; P[8]-2; and P[8]-3. These results showed that the RV-A G5 strains circulating in humans are the result of two independent zoonotic transmission events, most likely from pigs. *J. Med. Virol.* 83:357–366, 2011.

© 2010 Wiley-Liss, Inc.

**KEY WORDS:** gastroenteritis; group A rotavirus; genotype G5 lineages; phylogenetic analysis

## INTRODUCTION

Group A rotaviruses (RV-A) are the major cause of acute gastroenteritis in young children and in a wide variety of animals. These viruses, which belong to the *Reoviridae* family and *Rotavirus* genus are non-enveloped, icosahedral particles consisting of 11 segments of double-stranded genomic RNA (dsRNA) that are enclosed in a triple-layered protein capsid. The RV-A

gene segments are monocistronic and encode for six structural (VP1-4, 6, and 7) and four non-structural proteins (NSP1-4), except for the gene segment 11, which has two overlapping ORFs and encodes for NSP5 and NSP6. The RV-A binary classification system is based on the two outer capsid proteins analysis, VP7 and VP4, defining G (for glycoprotein) and P (for protease sensitive) genotypes, respectively. In extensive molecular studies, at least, 23 G and 32 P genotypes have been established for RV-A from humans and animals thus far [Abe et al., 2009; Matthijnsens et al., 2009; Schumann et al., 2009; Solberg et al., 2009; Ursu et al., 2009; Collins et al., 2010].

The most common RV-A G genotypes found in humans are G1–G4 and G9 [Gentsch et al., 2005; Santos and Hoshino, 2005; Leite et al., 2008]. Although it was originally believed that animal RV-A did not infect humans under natural conditions, the intensification of RV-A surveillance worldwide, together with the development of molecular characterization methods, have resulted in the detection of animal-like RV-A strains such as the porcine-like G5 strain in humans [Gentsch et al., 2005; Leite et al., 2008]. RV-A genotype G5, which are common in pigs but also found in horses, cattle and other animals, were identified in infected children in Brazil in the 1980s [Gouvea et al., 1994]. After 1996, the G5 genotype became only sporadically detected in Brazil

Grant sponsor: Oswaldo Cruz Institute—FIOCRUZ, through Project PAPER V/FIOCRUZ-National Council for Scientific and Technological Development (CNPq); Grant sponsor: General Coordination of Public Health Laboratories—Secretary of Health Surveillance (CGLAB/SVS/MH); Grant sponsor: FAPERJ.

\*Correspondence to: José Paulo Gagliardi Leite, Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental, Pav. Hélio & Peggy Pereira, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Avenida Brasil 4365, Mangueiras, 21040-360, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

E-mail: jppgleite@ioc.fiocruz.br

Accepted 13 September 2010

DOI 10.1002/jmv.21968

Published online in Wiley Online Library  
(wileyonlinelibrary.com).

© 2010 WILEY-LISS, INC.

[Leite et al., 2008]. Genotype G5 has lately been reported in children with severe diarrhea in Argentina [Bok et al., 2001], Paraguay [Coluchi et al., 2002], Cameroon [Esona et al., 2004, 2009], China [Duan et al., 2007], Vietnam [Ahmed et al., 2007], and Thailand [Chan-It et al., 2008], suggesting that the G5, although uncommon in humans, is present worldwide.

There are few studies investigating the phylogenetic relationship among human and animal G5 strains [Alfieri et al., 1996; Esona et al., 2004, 2009; Ahmed et al., 2007; Araujo et al., 2007; Duan et al., 2007; Chan-It et al., 2008]. Thus, the main purpose of this study was to carry out sequence analysis to characterize the VP7 and VP4 genes of Brazilian G5 RV-A strains, compared with other G5 RV-A strains of animal and human origin that circulate in different continents whose sequences are available in the NCBI Database at the GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>). Based on the phylogenetic analysis, the results of this study suggest the existence of three different G5 VP7 RV-A lineages and show the circulation of three VP4 lineages (P[8]-1, P[8]-2, and P[8]-3) in association with G5 VP7 genotype in Brazil between 1986 and 2005.

## MATERIALS AND METHODS

### Study Population

Twenty-eight diarrheic stool specimens genotyped as P[8]G5 were collected between 1986 and 2005 from children presenting acute diarrhea in public or in private hospitals in the states of Rio de Janeiro, São Paulo, Minas Gerais, and the Federal District of Brazil. The nucleotide sequence data reported in this study were submitted to GenBank with accession numbers: GQ377721–GQ377748 (VP7 gene) and GQ421818–GQ421845 (VP4 gene).

### Nucleic Acids Extraction, VP7, and VP4 Gene Amplification and Nucleotide Sequencing

The viral genomic dsRNA was extracted by the glass powder method [Boom et al., 1990]. The viral dsRNA was reverse transcribed (RT) and the VP7 gene was amplified using the consensus plus-sense primer 9con1 (37–56 nt), described by Das et al. [1994], together with the G5-genotyping minus-sense primer FT-5 positions (779–760 nt), described by Gouvea et al. [1994]. In the VP4 RT-PCR was used VP4 consensus primers 4con3 (11–32 nt) and 4con2 (887–868 nt) [Gentsch et al., 1992].

The VP7 and VP4 primers used to obtain the RT-PCR amplicon were employed individually for gene sequencing. Forward and reverse strand amplification reaction was carried out, at least twice, for each VP7 and VP4 sequence obtained. DNA sequencing was performed with an ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit® and an ABI Prism 3730 Genetic Analyzer® (both from Applied Biosystems, Foster City, CA) by Genomic Platform of DNA sequencing PDTIS/FIOCRUZ [Otto et al., 2008].

All procedures to avoid cross-contamination were performed, including negative controls (DNase/RNase free water—Gibco, Grand Island, NY—with RNaseOut—Invitrogen, Carlsbad, CA), during all steps.

### Phylogenetic and VP7 Genetic Distance Analyses

The sequences were aligned using the CLUSTAL W program [Thompson et al., 1994]. Phylogenetic and genetic distance analyses were performed using MEGA v.4.0 software package [Tamura et al., 2007]. Tree reconstructions were performed by the neighbor-joining method, based on the Kimura two-parameter model [Kimura, 1980]. Confidence values of the internal nodes were calculated by performing bootstrap analyses with 2,000 replicates. The mean genetic distances among distinct G5 RV-A groups were estimated with the Kimura two-parameter model for nucleotide distances, on the other hand the JTT model [Jones et al., 1992] was applied for amino acid distances and the Paml0–Bianchi–Li method [Li, 1993; Pamilo and Bianchi, 1993] for synonymous [dS] and nonsynonymous [dN] distances.

### Sequence Identity Study

Sequence identity matrices based on the nucleotide and amino acid sequences were constructed using the BioEdit Program, version 7.0.9.0 [Hall, 1999]. The nucleotide and amino acid sequences used for the matrix construction of VP7 and VP4 available in the NCBI Database at the GenBank were: (1) VP7: IAL28 (P[8]G5) (L79916), BrH8 (P[8]G5) (GAU1005), BR1054 (P[8]G5) (GAU1003), CC117 (P[?]\*G5) (L35056), A34 (P[23]G5) (L35059), H1 (P[7]G5) (AF242393), C134 (P[?]\*G5) (L35058), MRC3105 (P[8]G5) (AY327107), CMP178 (P[13]G5) (DQ515961), CMP204 (P[?]\*G5) (DQ683523), CMP206 (P[?]\*G5) (DQ683524), KJ75 (P[5]G5) (DQ494394), KJ44 (P[1]G5) (DQ494393), E-1 (P[7]G5) (FJ807802), K291 (P[7]G5) (EU541409), I-1 (P[7]G5) (FJ807853), 205-1 (P[7]G5) (FJ807849), K5 (P[7]G5) (EU541404), KV0404 (P[7]G5) (EU873013), JL94 (P[7]G5) (AY538665), 19 (P[7]G5) (FJ807816), A46 (P[?]\*G5) (L35054), 134/04-15 (P[26]G5) (DQ062572), LL36755 (P[6]G5) (EF077484), LL3354 (P[6]G5) (EF159575), LL4260 (P[6]G5) (EF159576), KH210 (P[6]G5) (AB257126), and 6784 (P[7]G5) (EF218667); (2) VP4: IAL28 (P[8]G5) (EF672584), BR1054 (P[8]G5) (GAU41004), BrH8 (P[8]G5) (GAU41006), L8 (P[8]G1) (AF061358), Wa (P[8]G1) (L34161), B3458 (P[8]G9) (EF990707), MW279 (P[8]G1) (AJ302144), Wi61 (P[8]G9) (EF672619), OP351 (P[8]G1) (AJ302147), MW670 (P[8]G4) (AJ302146), OP354 (P[8]G4) (AJ302148), F45 (P[8]G9) (U30716), DS-1 (P[4]G2) (EF672577), ITA-MAR37 (P[8]G9) (EF150324), OP530 (P[8]G4) (AJ302152), Phim (P[8]G1) (AF061361), rj1527/98 (P[8]G9) (FN179464), rj1609/98 (P[8]G9) (FN179467), rj11759/05 (P[8]G9) (FN179470), rj4880/01 (P[8]G9) (DQ857899), rj4883/01 (P[8]G9) (DQ857900), and rj4956/01 (P[8]G9) (DQ857901) (\*non-typable).

### VP7 Positive Selection Analyses

Three different codon-based maximum likelihood methods were performed to estimate the dN/dS ratio at every codon position using the HyPhy package [Pond et al., 2005] available at <http://www.hyphy.org/>. These methods included: (a) single-likelihood ancestor counting (SLAC); (b) fixed effects likelihood (FEL); (c) random effects likelihood (REL).

### 3D Protein Structure Prediction

The crystallographic structure of VP4 and VP7 proteins from P[8]G5 RV-A strains are currently unknown. In order to model 3D structures of both proteins, we employed the most approximate structures available. For these reasons, crystallography data of the VP4 protein of the human RV-A Wa strain (P[8]G1) was imported from Protein Data Bank (PDB, accession number 2DWR) [Blanchard et al., 2007] by the use of an Interactive Server-Side Molecule Image Generator (AISMIG) [Bohne-Lang et al., 2005]. In the case of VP7, crystallography data of this protein from RRV strain (P[3]G3) was imported from the Protein Data Bank (PDB) under accession number 3FMG [Aoki et al., 2005], using the PDB ProteinWorkshop 3.6 program from PDB (available at [www.rcsb.org/pdb](http://www.rcsb.org/pdb)).

## RESULTS AND DISCUSSION

### Analysis of VP7 Gene

In order to gain insight into the degree of genetic variability in the P[8]G5 RV-A strains circulating in Brazil, the sequences of VP7 gene from 28 human RV-A G5 strains circulating in different Brazilian states were compared with the sequences of the human RV-A G5 prototypes from Brazil (IAL28, H8, BR1054), China (LL4260, LL36755, LL3354), Cameroon (6484, MRC3105), Thailand (CMP178, CMP204, CMP206), and Vietnam (KH210) as well as RV-A G5 prototype strains from equine, porcine, and bovine [Ciarlet et al., 2001; Park et al., 2006; Ha et al., 2009].

Phylogenetic analysis of the RV-A G5 strains allowed the identification of three major monophyletic clusters (Fig. 1). The first cluster (lineage I) included all of the Brazilian strains sampled between 1986 and 2005, which segregated into a highly supported sub-cluster (bootstrap of 100%) and three porcine strains collected in Thailand (CMP178, CMP204, CMP206) [Chan-It et al., 2008]. The second cluster (lineage II) contained only G5 sequences from animals: porcine (I-1, E-1, 19, 07-25, 205-1, 134/04-15, 344/04-1, A46, JL94), bovine (KJ75, KJ44, K291, K5, KV0407), and equine (H-1), from different continents (North and South America, Europe, and Asia) that were isolated between 1994 and 2008 [Ciarlet et al., 1995, 2001; Martella et al., 2006, 2007; Park et al., 2006; Ha et al., 2009]. The third cluster (lineage III) is comprised of the RV-A G5 human strains isolated in Asia (LL36755, LL3354, LL4260, KH210), Africa (MRC3105, 6784), and two porcine strains from Argentina (C134, CC117) collected in 1994 [Ciarlet

et al., 1995; Esona et al., 2004, 2009; Ahmed et al., 2007; Duan et al., 2007; Li et al., 2008].

The analyses of the genetic distances revealed that the mean nucleotide identity among the G5 lineages ranges from 82.0% to 85.4% (Table I). Thus, according to the new RV-A classification system proposed by Matthijnsens et al. [2008b], which utilizes an intra-genotype nucleotide identity cutoff value of 80.0% for the VP7 gene, all G5 lineages identified in this study effectively belong to the same genotype. The amino acid identity among the G5 lineages (ranging from 91.3% to 92.4%) was higher than that observed at the nucleotide level (data not shown), indicating that synonymous substitutions were responsible for most of the variation that had accumulated among the lineages. Indeed, the mean similarity for nucleotide synonymous (dS) and non-synonymous (dN) distances revealed that the dN level was much higher than the observed at dS level (Table I). No positively selected codon positions were identified at the VP7 gene by the SLAC, FEL, or REL methods implemented in the HyPhy program [Pond et al., 2005] and this further indicates that evolution of the RV-A G5 strains at the VP7 gene is mainly driven by purifying selection.

The results obtained in the phylogenetic and genetic distance analysis strongly suggest that the human RV-A G5 strains are result of two independent zoonotic transmission events: (a) one resulting in the human lineage detected in Brazil; (b) the other resulting in the lineage circulating in Asia and Africa. The porcine strains are presented in the most basal positions within each cluster, suggesting that pigs are the main natural reservoir and source of the RV-A G5 strains for humans and other animal species. Although the previous Brazilian RV-A G5 study [Alfieri et al., 1996] reporting the genetic relatedness between animal and human RV-A G5 genes by RNA-RNA hybridization and gene sequencing, no human RV-A G5 VP7 sequences were available at the Genbank, which may explain the closest relationship between those previous human RV-A G5 VP7 sequences and the RV-A G5 porcine OSU VP7 sequence. The present study demonstrate that the VP7 gene from the RV-A G5 Brazilian strains have been adapted in humans for, at least, two decades suggesting that molecular characterization analysis should be performed in order to confirm previous studies. These analyses also revealed that the human VP7 RV-A G5 strains that have been circulating in Brazil since 1986, and identification of all isolates up to 2005 as lineage I, suggests that there is no evidence for the introduction of new RV-A G5 lineages in this country.

Four different major variable regions have been described for RV-A VP7: A region-amino acid positions (87–101), B region (143–152), C region (208–223), and F region (235–242) [Dyall-Smith et al., 1986; Kobayashi et al., 1991; Ciarlet et al., 1997; Kirkwood and Buttery, 2003]. The alignment of the deduced amino acid sequences from VP7 gene revealed amino acid substitutions inside of the variable region C at positions 213<sup>S→N</sup> and 217<sup>T→I</sup> (Figs. 3 and 5).



Fig. 1. VP7 phylogeny of G5 strains. Neighbor-joining phylogenetic tree analysis of structural genes of P[8]G5 Rotaviruses A isolated in Brazil. Bootstrap values (2,000 replicates) are shown at the branch nodes, values lower than 50% are not shown. The scale bar at the bottom of the trees indicates distance. The strains in bold marked with \* indicate the Brazilian P[8]G5 strains sequenced in this study.

TABLE I. Percentage of Nucleotide, dN, dS, and Amino Acid Similarity Between the Three G5 VP7 Lineages

Similarity between lineages	dS (%)	dN (%)	Amino acid (%)
Lineage 1 × lineage 2	52.9	95.1	91.3
Lineage 1 × lineage 3	33.1	95.4	92.4
Lineage 2 × lineage 3	33.3	95.9	92.4

dS, synonymous distance; dN, non-synonymous distance.

*J. Med. Virol.* DOI 10.1002/jmv

All samples isolated in Distrito Federal (df30726/86, df30730/86, and df307373/86) and one from São Paulo (sp30950/86) showed amino acid substitutions at position 72<sup>A-V</sup>. At position 123<sup>D-Y</sup> was found amino acid substitution in four samples isolated in Rio de Janeiro (rj1713/98, rj1716/98, rj1719/98, and rj1865/98). The change at position 12<sup>V-I</sup> was observed in samples isolated in Rio de Janeiro between 1990 and 2005. Some of the samples isolated between 1986 and 1996 showed



amino acid substitutions at positions 200<sup>T→A</sup> and 225<sup>V→A</sup> (Fig. 3).

The same analysis in this study showed amino acid substitutions in all VP7 sequences studied, some of them outside of the previously identified neutralization domains in the surface structural proteins of the virus. Removal of free calcium ions (Ca<sup>2+</sup>) dissociates VP7 trimers into monomers, releasing VP7 from the virion, and initiates penetration-inducing conformational changes in the other outer-layer protein, VP4. Some of the samples isolated between 1986 and 1996 shared an amino acid substitution at position 213<sup>S→N</sup> and five

strains isolated in São Paulo in 1986 (sp30844/86, sp30845/86, sp30846/86, sp30851/86, and sp30860/86) shared an amino acid substitution at position 217<sup>T→I</sup> both inside the antigenic site C and spatially very close to the major antigenic site B. Those substitutions could modify the antigenicity of the corresponding region (Fig. 5). Further studies will be needed to determine the potential effects of the substitution changes identified in this study.

The crystallographic structures of P[8]G5 RV-A VP4 and VP7 proteins strains are currently unknown. In this study we employed the most approximate available

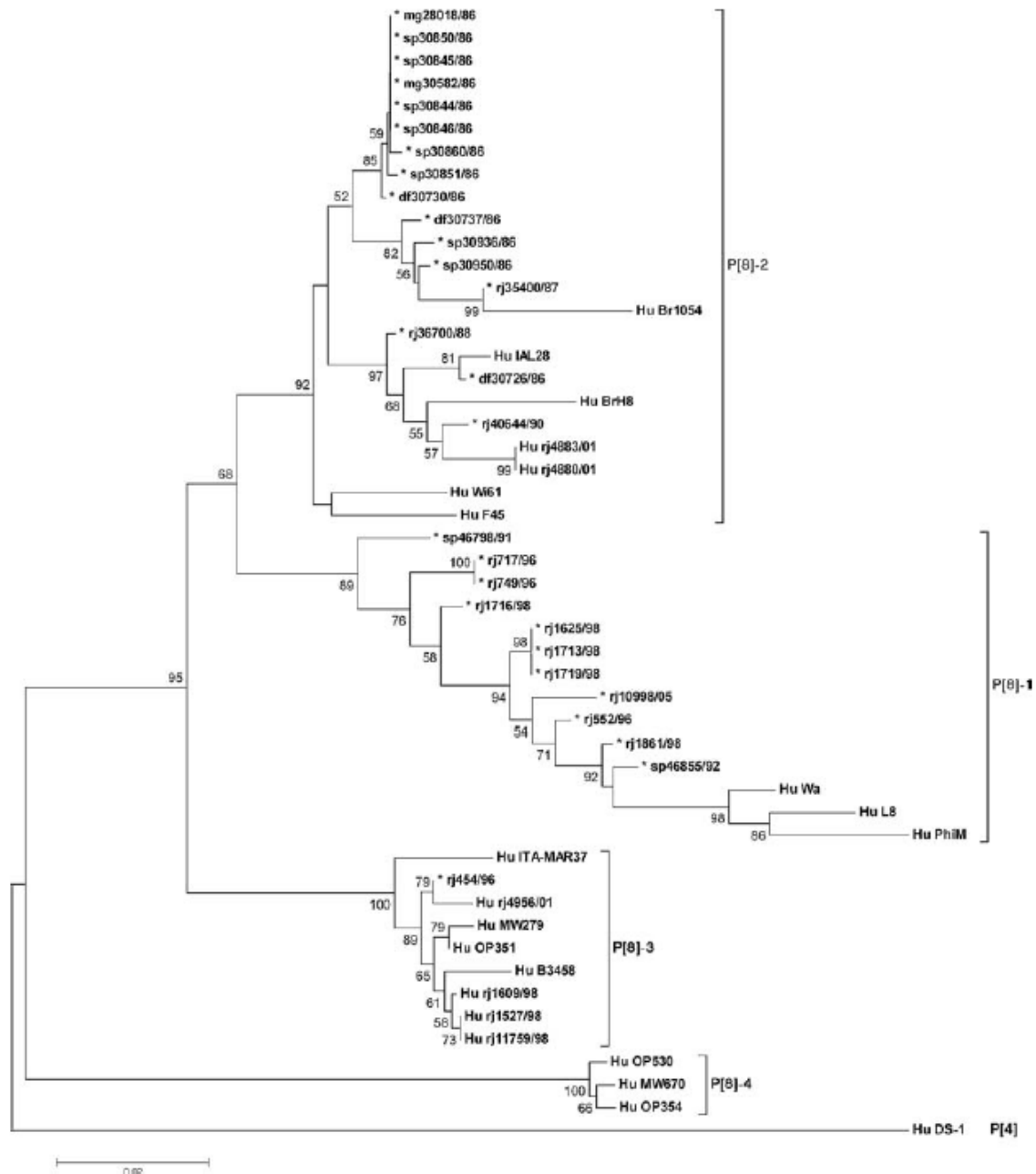


Fig. 2. VP4 phylogeny of P[8] strains. Neighbor-joining phylogenetic tree analysis of structural genes of P[8]G5 Rotaviruses A isolated in Brazil. Bootstrap values (2,000 replicates) are shown at the branch nodes, values lower than 50% are not shown. The scale bar at the bottom of the trees indicates distance. The strains in bold marked with \* indicate the Brazilian P[8]G5 strains sequenced in this study.

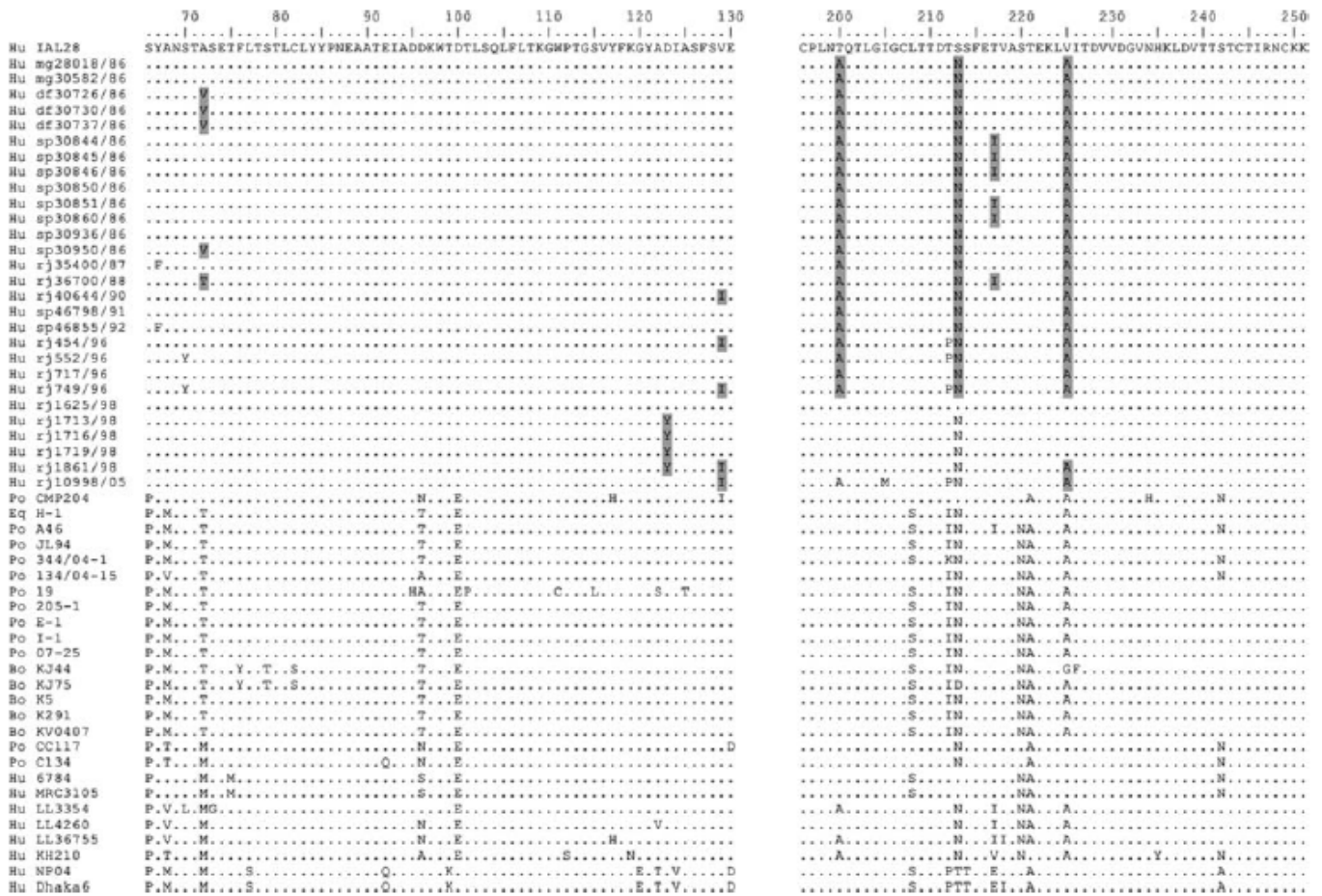


Fig. 3. Alignment of VP7 amino acid sequences from Rotavirus A genotype P[8]G5 strains isolated in Brazil with prototypes rotaviruses A strains. Strains are shown by name at the left side of the figure. Identity to strain IAL28 is shown by a dot. Amino acids are denoted by a one-letter abbreviation. Numbers at the top of each alignment denote amino acid positions. The figure shows the regions of the alignment that have specific amino acid substitutions of the Brazilian genotype P[8]G5 strains denoted by a gray column.

structures for both proteins, obtained from RV-A strains belonging to other genotypes: VP7 protein data from RRV strain (P[3]G3) and VP4 protein of the human RV-A Wa strain (P[8]G1). Crystal structure determinations of VP7 and VP4 proteins from P[8]G5 strains will be relevant to obtain a potential theory to the possible effects of the substitutions found in VP7 and VP4 proteins here reported. Also, the association of the effects that these substitutions may have with virus interaction versus or against the immune system also remains to be established.

**Analysis of VP4 Gene**

The phylogenetic analysis from partial VP8\* subunit of VP4 gene sequences showed that between 1986 and 2005, three different P[8] lineages circulated in association with the G5 genotype in Brazil: (a) P[8]-2, strains collected between 1986 and 1990; (b) P[8]-1, strains collected between 1991 and 2005; and (c) P[8]-3, a strain collected in Rio de Janeiro in 1996 (rj454/96) (Fig. 2). It could be observed that the strains collected in Brazil by the year 1990 grouped with the human

Brazilian prototypes BR1054, BrH8, F45 [Alfieri et al., 1996] and IAL28 [Gouvea et al., 1999] with a 92% Bootstrap value, all belonging to lineage P[8]-2. Most of the strains collected between 1991 and 2005 clustered with strains of specific P[8]G1 RV-A prototypes Wa [Padilla-Noriega et al., 1995], L8 and Phim [Gouvea et al., 1999], all belonging to the lineage P[8]-1. The strain rj454/96 as well as human G9 RV-A prototypes B3458 [Matthijnsens et al., 2008a], MW279 and OP351 [Cunliffe et al., 2001], rj11759/05, rj1609/98, rj1527/98 [Tort et al., 2010], rj4956/01 [Araujo et al., 2007], and ITA-MAR37 [Ansaldi et al., 2007], belongs to the lineage P[8]-3.

Five VP8\* neutralization epitopes (M1-L10, I35-R44, I55-D66, V115-G123, and L223-P234) has been described so far [Taniguchi et al., 1989; Padilla-Noriega et al., 1995; Kirkwood et al., 1996]. The comparative alignment analysis demonstrated the high genetic heterogeneity among the sequences (Fig. 4). The alignment of the deduced amino acid sequences of VP8\* revealed amino acid substitutions inside the variable regions: (a) I35→R44 at positions 35<sup>V-1</sup> in strains collected between 1992 and 2005, except the rj454/96

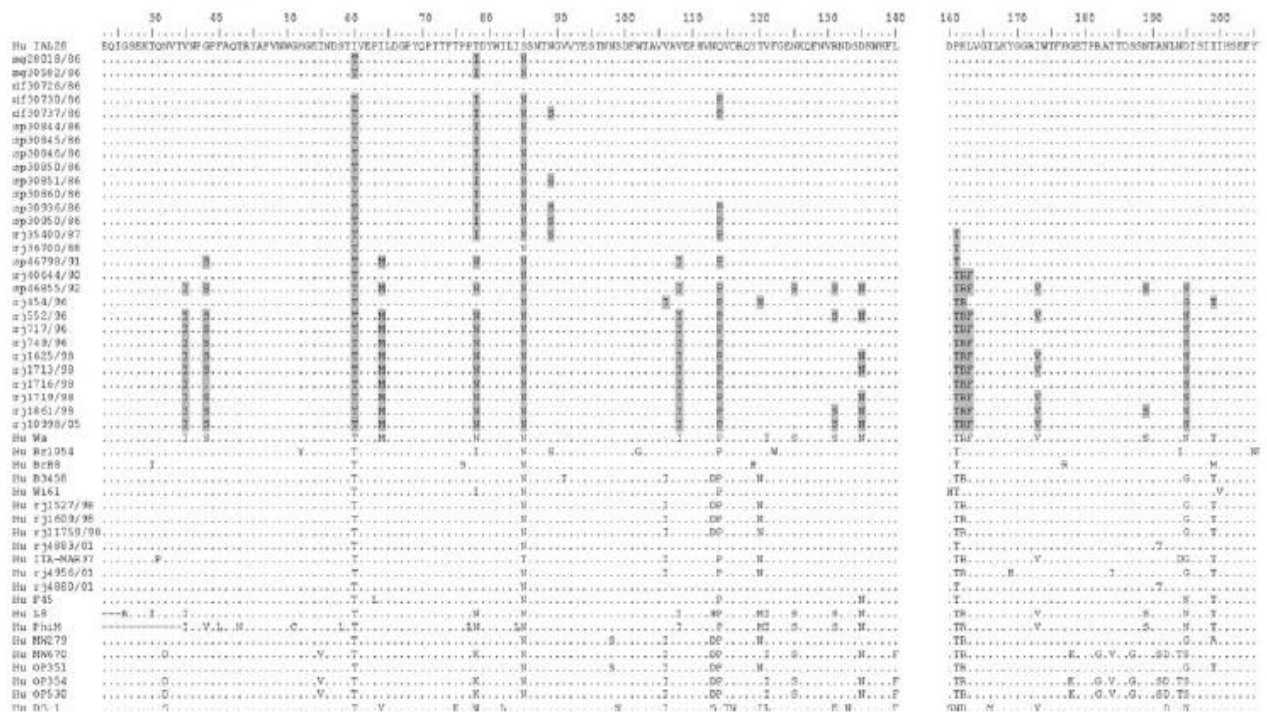


Fig. 4. Alignment of VP4 amino acid sequences from Rotavirus A genotype P[8]G5 strains isolated in Brazil with prototypes rotaviruses A strains. Strains are shown by name at the left side of the figure. Identity to strain IAL28 is shown by a dot. Amino acids are denoted by a one-letter abbreviation. Numbers at the top of each alignment denote amino acid positions. The figure shows the regions of the alignment that have specific amino acid substitutions of the Brazilian genotype P[8]G5 strains denoted by a gray column.

strain, collected in Rio de Janeiro in 1996; and 38<sup>G→S</sup> in strains collected between 1991 and 2005, with the exception of rj454/96 and rj1716/98 strains, collected in Rio de Janeiro in 1996 and 1998, respectively; (b) I55-D66 at positions, 60<sup>I→T</sup> in all strains, except for the df30726/96 strain, collected in 1986 in the Federal District and 64<sup>I→M</sup> in strains collected from the year 1991, with the exception of rj454/96 strain; (c) V115-G123, 120<sup>T→N</sup> in the rj454/96 strain (Fig. 6). Other amino acid substitutions were observed outside VP8\*

hyper-variable regions in the majority of analyzed strains: 78<sup>T→I/N</sup>, 85<sup>S→N</sup>, 89<sup>N→S</sup>, 106<sup>V→I</sup>, 108<sup>V→I</sup>, 114<sup>Q→P</sup>, 125<sup>N→S</sup>, 131<sup>R→S</sup>, 135<sup>D→N</sup>, 145<sup>S→G</sup>, 150<sup>E→D</sup>, 161<sup>P→T</sup>, 162<sup>K→R</sup>, 163<sup>L→F</sup>, 173<sup>I→V</sup>, 189<sup>N→S</sup>, 195<sup>D→N/G</sup>, and 199<sup>I→T</sup>.

Currently, four distinct RV-A genotype P[8] lineages were described worldwide (P[8]-1, P[8]-2, P[8]-3, and P[8]-4) [Gouvea et al., 1999; Cunliffe et al., 2001; Arista et al., 2005]. Preview studies show that three P[8] lineages (P[8]-1, P[8]-2, and P[8]-3) associated with different

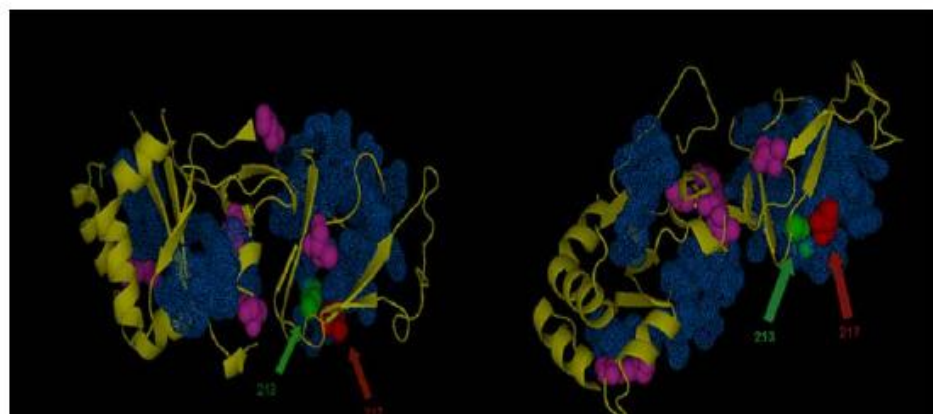


Fig. 5. 3D model of VP7 protein. A 3D trimeric model of the rhesus Rotavirus VP7 protein is shown (PDB accession number 3FMG). Three views of the molecule, rotated under the x, y, and z axis are shown in A–C, respectively. Residues corresponding to previously described major antigenic sites A–D are indicated in dot space filling representation blue. Amino acid substitution at position 213S → N and 217T → I found in Brazilian P[8]G5 strains is shown in green and red, respectively. Its position is indicated by numbers and shown by arrows. [See color version online at wileyonlinelibrary.com]

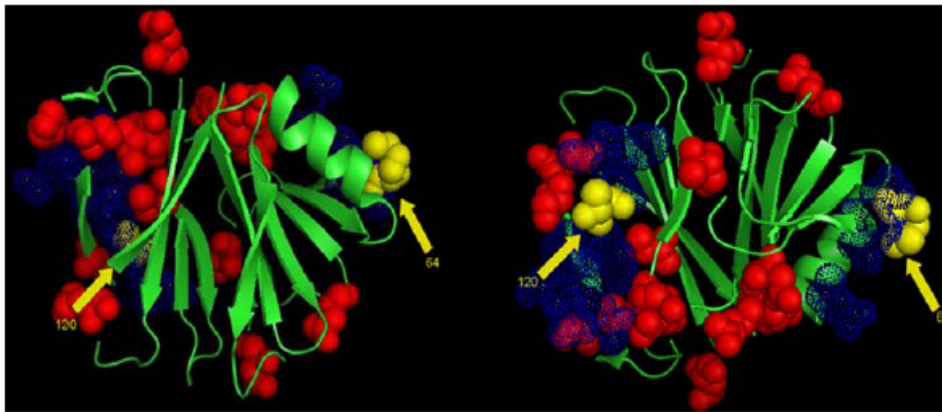


Fig. 6. 3D model of VP8\* sub-unit of VP4 protein. A 3D model of VP8\* sub-unit structure of human Wa RV-A strain is shown. Two views of the molecule rotated under the x-axis are shown. Amino acid substitutions observed in variable regions of strains isolated in Brazil and others prototypes strains used in the phylogenetic study (64I → M and 120T → N) are shown in yellow and solid space filling representation. Their respective positions are indicated by numbers. Neutralization domains 155-66D, V115-123G, and L223-234 are shown in blue. [See color version online at wileyonlinelibrary.com]

G genotypes were detected in Brazil in the last two decades [Gouvea et al., 1999; Araujo et al., 2007; Tort et al., 2010]. There are no available data showing the lineage P[8]-4 detection in Brazil.

Among the different P[8] lineages circulated in Brazil in association with different genotypes (G1, G4, and G9), in this study were detected, associated to G5 RV-A strains, the three P[8] lineages previously detected in Brazil (P[8]-1, P[8]-2, and P[8]-3). Strains collected by the year 1990 grouped in a cluster containing the human Brazilian prototypes IAL28, BR1054, and BrH8, which were all classified as P[8]-2 lineage. The majority of strains collected between 1991 and 2005 were classified as P[8]-1 lineage, grouping with human prototypes Wa, Phim, and L8. The only exception was the strain rj454/96, which was collected in Rio de Janeiro in 1996, that grouped with human prototypes B3458 [Matthijnssens et al., 2008a], MW279 and OP351 [Cunliffe et al., 2001], ITA-MAR37 [Ansaldi et al., 2007], rj4956/01 [Araujo et al., 2007], rj1527/98, rj1609/98, and rj11759/98 [Tort et al., 2010] (bootstrap 100%), classified as P[8]-3 lineage.

In conclusion, the results presented in this study are showing that the RV-A G5 strains could be divided into three major lineages: (a) lineage I, including all Brazilian strains and three porcine strains from Thailand; (b) lineage II, including only animal strains; and (c) lineage III, including human strains from Africa and Asia, and two porcine strains from Argentina. The human RV-A G5 strains identified to date are the consequence of two independent interspecies transmission events, most likely from pigs. These results suggest that adaption of the porcine RV-A G5 strains to humans was not associated with a particularly high amino acid substitution rate at the VP7 gene. This work contributes for a better understanding of the dynamics and pattern of RV-A G5 evolution and highlights the importance of continuous virological surveillance of circulating RV-A to characterize new variants and the potential spreading of these variants. Referred studies

should also be implemented, particularly, in countries in which health authorities have introduced a RV-A vaccine as preventive policy in the national immunization schedule.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Alexandre Madi Fialho for technical assistance, to mothers who agreed that their children participate in this study and the private and state hospitals for providing samples for the development of this study. Marcelle Figueira Marques da Silva was a Master student of the Cellular and Molecular Biology Program at Oswaldo Cruz Institute/Fiocruz and a recipient of a scholarship from the Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education (CAPES) in association with the Carlos Chagas Filho Foundation for Research Support of the State of Rio de Janeiro (FAPERJ).

#### REFERENCES

- Abe M, Ito N, Morikawa S, Takasu M, Murase T, Kawashima T, Kawai Y, Kohara J, Sugiyama M. 2009. Molecular epidemiology of rotaviruses among healthy calves in Japan: Isolation of a novel bovine rotavirus bearing new P and G genotypes. *Virus Res* 144: 250–257.
- Ahmed K, Anh DD, Nakagomi O. 2007. Rotavirus G5P[6] in child with diarrhea, Vietnam. *Emerg Infect Dis* 13:1232–1235.
- Alfieri A, Leite J, Nakagomi O, Kaga E, Woods P, Glass R, Gentsch J. 1996. Characterization of human rotavirus genotype P[8]G5 from Brazil by probe-hybridization and sequence. *Arch Virol* 141:2353–2364.
- Ansaldi F, Pastorino B, Valle L, Durando P, Sticchi L, Tucci P, Biasci P, Lai P, Gasparini R, Icardi G. 2007. Molecular characterization of a new variant of rotavirus P[8]G9 predominant in a sentinel-based survey in central Italy. *J Clin Microbiol* 45:1011–1015.
- Aoki ST, Settembre EC, Trask SD, Greenberg HB, Harrison SC, Dormitzer PR. 2005. Structure of rotavirus outer-layer protein VP7 bound with a neutralizing Fab. *Science* 324:1444–1447.
- Araujo IT, Assis RM, Fialho AM, Mascarenhas JD, Heinemann MB, Leite JP. 2007. Brazilian P[8]G1, P[8]G5, P[8]G9, and P[4]G2 rotavirus strains: Nucleotide sequence and phylogenetic analysis. *J Med Virol* 79:995–1001.
- Arista S, Giammanco GM, De Grazia S, Colomba C, Martella V, Cascio A, Iturriza-Gomara M. 2005. G2 rotavirus infections in an infantile

- population of the South of Italy: Variability of viral strains over time. *J Med Virol* 77:587–594.
- Blanchard H, Yu X, Coulson BS, von Itzstein M. 2007. Insight into host cell carbohydrate-recognition by human and porcine rotavirus from crystal structures of the virion spike associated carbohydrate-binding domain (VP8\*). *J Mol Biol* 367:1215–1226.
- Bohne-Lang A, Groch WD, Ranzingel R. 2005. AISMIG—An interactive server-side molecule image generator. *Nucleic Acids Res* 33:705–709.
- Bok K, Castagnaro N, Borsari A, Nates S, Espul C, Fay O, Fabri A, Grinstein S, Miceli I, Matson DO, Gomez JA. 2001. Surveillance for rotavirus in Argentina. *J Med Virol* 65:190–198.
- Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, van der Noordaa J. 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 28:495–503.
- Chan-It W, Khamrin P, Saekhow P, Pantip C, Thongprachum A, Peerakome S, Ushijima H, Maneekarn N. 2008. Multiple combinations of P[13]-like genotype with G3, G4, and G5 in porcine rotaviruses. *J Clin Microbiol* 46:1169–1173.
- Ciarlet M, Ludert JE, Liprandi F. 1995. Comparative amino acid sequence analysis of the major outer capsid protein (VP7) of porcine rotaviruses with G3 and G5 serotype specificities isolated in Venezuela and Argentina. *Arch Virol* 140:437–451.
- Ciarlet M, Hoshino Y, Liprandi F. 1997. Single point mutations may affect the serotype reactivity of serotype G11 porcine rotavirus strains: A widening spectrum? *J Virol* 71:8213–8220.
- Ciarlet M, Conner M, Liprandi F. 2001. Antigenic and molecular analyses reveal that the equine rotavirus strain H-1 is closely related to porcine, but not equine, rotaviruses: Interspecies transmission from pigs to horses? *Virus Genes* 22:5–20.
- Collins PJ, Martella V, Sleator RD, Fanning S, O'Shea H. 2010. Identification of a G2-like porcine rotavirus bearing a novel VP4 type, P[32]. *Vet Res* 41:73.
- Coluchi N, Munford V, Manzur J, Vazquez C, Escobar M, Weber E, Marmol P, Racz ML. 2002. Detection, subgroup specificity, and genotype diversity of rotavirus strains in children with acute diarrhea in Paraguay. *J Clin Microbiol* 40:1709–1714.
- Cunliffe NA, Gondwe JS, Graham SM, Thindwa BD, Dove W, Broadhead RL, Molyneux ME, Hart CA. 2001. Rotavirus strain diversity in Blantyre, Malawi, from 1997 to 1999. *J Clin Microbiol* 39:836–843.
- Das BK, Gentsch JR, Cicirello HG, Woods PA, Gupta A, Ramachandran M, Kumar R, Bhan MK, Glass RI. 1994. Characterization of rotavirus strains from newborns in New Delhi, India. *J Clin Microbiol* 32:1820–1822.
- Duan ZJ, Li DD, Zhang Q, Liu N, Huang CP, Jiang X, Jiang B, Glass R, Steele D, Tang JY, Wang ZS, Fang ZY. 2007. Novel human rotavirus of genotype G5P[6] identified in a stool specimen from a Chinese girl with diarrhea. *J Clin Microbiol* 45:1614–1617.
- Dyall-Smith ML, Lazdins I, Tregear GW, Holmes IH. 1986. Location of the major antigenic sites involved in rotavirus serotype-specific neutralization. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:3465–3468.
- Esona MD, Armah GE, Geyer A, Steele AD. 2004. Detection of an unusual human rotavirus strain with G5P[8] specificity in a Cameroonian child with diarrhea. *J Clin Microbiol* 42:441–444.
- Esona MD, Geyer A, Banyai K, Page N, Aminu M, Armah GE, Hull J, Steele DA, Glass RI, Gentsch JR. 2009. Novel human rotavirus genotype G5P[7] from child with diarrhea, Cameroon. *Emerg Infect Dis* 15:83–86.
- Gentsch JR, Glass RI, Woods P, Gouvea V, Gorziglia M, Flores J, Das BK, Bhan MK. 1992. Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 30:1365–1373.
- Gentsch J, Laird A, Bielfelt B, Griffin D, Banyai K, Ramachandran M, Jain V, Cunliffe N, Nakagomi O, Kirkwood C, Fischer T, Parashar U, Bresee J, Jiang B, Glass R. 2005. Serotype diversity and reassortment between human and animal rotavirus strains: Implications for rotavirus vaccine programs. *J Infect Dis* 192: S146–S159.
- Gouvea V, de Castro L, Timenetsky MC, Greenberg H, Santos N. 1994. Rotavirus serotype G5 associated with diarrhea in Brazilian children. *J Clin Microbiol* 32:1408–1409.
- Gouvea V, Lima R, Linhares R, Clark H, Nosawa C, Santos N. 1999. Identification of two lineages (WA-like and F45-like) within the major rotavirus genotype P[8]. *Virus Res* 59:141–147.
- Ha TP, Kim HJ, Saif LJ, Jeong YJ, Kim HH, Kwon HJ, Park SJ, Cho KO. 2009. Sequence analysis of unusual P[7]G5 bovine rotavirus strains reveals evidence of interspecies transmission. *J Clin Microbiol* 47:3329–3332.
- Hall T. 1999. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 41:95–98.
- Jones DT, Taylor WR, Thornton JM. 1992. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Comput Appl Biosci* 8:275–282.
- Kimura MA. 1980. Simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 16:111–120.
- Kirkwood CD, Buttery J. 2003. Rotavirus vaccines—An update. *Expert Opin Biol Ther* 3:97–105.
- Kirkwood CD, Bishop RF, Coulson BS. 1996. Human rotavirus VP4 contains strain-specific, serotype-specific and cross-reactive neutralization sites. *Arch Virol* 141:587–600.
- Kobayashi N, Taniguchi K, Urasawa S. 1991. Analysis of the neutralization epitopes on human rotavirus VP7 recognized by monotype-specific monoclonal antibodies. *J Gen Virol* 72:1855–1861.
- Leite JP, Carvalho-Costa FA, Linhares AC. 2008. Group A rotavirus genotypes and the ongoing Brazilian experience: A review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103:745–753.
- Li WH. 1993. Unbiased estimation of the rates of synonymous and nonsynonymous substitution. *J Mol Evol* 36:96–99.
- Li DD, Duan ZJ, Zhang Q, Liu N, Xie ZP, Jiang B, Steele D, Jiang X, Wang ZS, Fang ZY. 2008. Molecular characterization of unusual human G5P[6] rotaviruses identified in China. *J Clin Virol* 42:141–148.
- Martella V, Ciarlet M, Banyai K, Lorusso E, Cavalli A, Corrente M, Elia G, Arista S, Camero M, Desario C, Decaro N, Lavazza A, Buonavoglia C. 2006. Identification of a novel VP4 genotype carried by a serotype G5 porcine rotavirus strain. *Virology* 346: 301–311.
- Martella V, Ciarlet M, Banyai K, Lorusso E, Arista S, Lavazza A, Pezzotti G, Decaro N, Cavalli A, Lucente MS, Corrente M, Elia G, Camero M, Tempesta M, Buonavoglia C. 2007. Identification of group A porcine rotavirus strains bearing a novel VP4 (P) genotype in Italian swine herds. *J Clin Microbiol* 45:577–580.
- Matthijnsens J, Ciarlet M, Heiman E, Arijis I, Delbeke T, McDonald SM, Palombo EA, Iturriza-Gómara M, Maes P, Patton JT, Rahman M, Van Ranst M. 2008a. Full genome-based classification of rotaviruses reveals a common origin between human Wa-Like and porcine rotavirus strains and human DS-1-like and bovine rotavirus strains. *J Virol* 82:3204–3219.
- Matthijnsens J, Ciarlet M, Rahman M, Attoui H, Banyai K, Estes MK, Gentsch JR, Iturriza-Gómara M, Kirkwood CD, Martella V, Mertens PP, Nakagomi O, Patton JT, Ruggeri FM, Saif LJ, Santos N, Steyer A, Taniguchi K, Desselberger U, Van Ranst M. 2008b. Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. *Arch Virol* 153:1621–1629.
- Matthijnsens J, Bilcke J, Ciarlet M, Martella V, Banyai K, Rahman M, Zeller M, Beutels P, Van Damme P, Van Ranst M. 2009. Rotavirus disease and vaccination: Impact on genotype diversity. *Future Microbiol* 4:1303–1316.
- Nakagomi O, Nakagomi T. 1993. Interspecies transmission of rotaviruses studied from the perspective of genogroup. *Microbiol Immunol* 37:337–348.
- Otto TD, Vasconcelos EA, Gomes LH, Moreira AS, Degraive WM, Mendonca-Lima L, Alves-Ferreira M. 2008. ChromaPipe: A pipeline for analysis, quality control and management for a DNA sequencing facility. *Genet Mol Res* 7:861–871.
- Padilla-Noriega L, Dunn SJ, Lopez S, Greenberg HB, Arias CF. 1995. Identification of two independent neutralization domains on the VP4 trypsin cleavage products VP5\* and VP8\* of human rotavirus ST3. *Virology* 206:148–154.
- Pamilo P, Bianchi NO. 1993. Evolution of the Zfx and Zfy genes: Rates and interdependence between the genes. *Mol Biol Evol* 10:271–281.
- Park SH, Saif LJ, Jeong C, Lim GK, Park SI, Kim HH, Park SJ, Kim YJ, Jeong JH, Kang MI, Cho KO. 2006. Molecular characterization of novel G5 bovine rotavirus strains. *J Clin Microbiol* 44:4101–4112.
- Pond SL, Frost SD, Muse SV. 2005. HyPhy: Hypothesis testing using phylogenies. *Bioinformatics* 21:676–679.
- Santos N, Hoshino Y. 2005. Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *Rev Med Virol* 15:29–56.

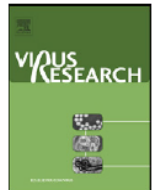
- Schumann T, Hotzel H, Otto P, Johne R. 2009. Evidence of interspecies transmission and reassortment among avian group A rotaviruses. *Virology* 386:334–343.
- Solberg OD, Hasing ME, Trueba G, Eisenberg JN. 2009. Characterization of novel VP7, VP4, and VP6 genotypes of a previously untypeable group A rotavirus. *Virology* 385:58–67.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24:1596–1599.
- Taniguchi K, Nishikawa K, Urasawa S, Mielthun K, Kapikian AE, Gorgiglia H. 1989. Complete nucleotide sequence of the gene VP4 encoding VP4 of a human rotavirus (strain K8) which has unique VP4 neutralization epitopes. *Jrnl Virol* 63:4101–4106.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22:4673–4680.
- Tort LF, Volotao ED, de Mendonca MC, da Silva MF, Siqueira AA, Assis RM, Moratorio G, Cristina J, Leite JP. 2010. Phylogenetic analysis of human P[8]G9 rotavirus strains circulating in Brazil reveals the presence of a novel genetic variant. *J Clin Virol* 47:345–355.
- Úrsu K, Kisfalvi P, Rigo D, Ivanics E, Erdelyi K, Dan A, Melegh B, Martella V, Banyai K. 2009. Molecular analysis of the VP7 gene of pheasant rotaviruses identifies a new genotype, designated G23. *Arch Virol* 154:1365–1369.

2. **Artigo 2:** Análise filogenética dos genes que codificam para as proteínas VP1, VP2 e VP3 de cepas de rotavirus A de genótipo G5P[8] circulando no Brasil entre 1986 e 2005.

**Publicado em:** Virus research

**Fator de impacto:** 2,745

**Resumo:** Neste estudo foram realizadas análises filogenéticas baseadas nos genes que codificam para as proteínas VP1, VP2 e VP3 de cepas de genótipo G5P[8] circulantes no Brasil entre 1986 e 2005. Os resultados demonstraram que as sequências aminoacídicas de VP1, VP2 e VP3 das cepas brasileiras de genótipo G5 apresentam um elevado grau de similaridade com o único isolado humano de genótipo G5 (IAL-28) e com outras cepas do genótipo *Wa-like*. As cepas demonstraram um padrão de agrupamento similar para todos os genes estudados, onde cepas brasileiras tendem a agrupar com outras cepas de origem humana e as cepas de origem animal agrupam separadamente. A similaridade encontrada para os genes das proteínas VP1, VP2 e VP3 das cepas brasileiras de genótipo G5 e cepas humanas *Wa-like* de outros genótipos G sugere uma ancestralidade comum destas cepas.



## Phylogenetic analysis of VP1, VP2, and VP3 gene segments of genotype G5 group A rotavirus strains circulating in Brazil between 1986 and 2005

Marcelle Figueira Marques da Silva\*, Luis Fernando López Tort, Mariela Martínez Gómez, Rosane M. Santos Assis, Marcos César Lima de Mendonça, Eduardo de Mello Volotão, José Paulo G. Leite

Laboratory of Comparative and Environmental Virology, Oswaldo Cruz Institute – FIOCRUZ, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 28 April 2011

Received in revised form 21 July 2011

Accepted 22 July 2011

Available online xxx

#### Keywords:

Group A rotavirus

Genotype G5

VP1, VP2, VP3 gene segments

Phylogenetic analysis

### ABSTRACT

Genotype G5 group A rotavirus (RV-A), which is common in pigs and also detected in horses and cattle, circulated as endemic genotype in the 1980s and early 1990s in Brazil. After 1996, G5 RV-A has been replaced by G9 RV-A, becoming only sporadically detected. Recently, G5 has been reported in children with severe diarrhea in Argentina, Cameroon, Paraguay, People's Republic of China, and Vietnam, suggesting that, although uncommon in humans, it has a worldwide distribution. In a previous study, Brazilian G5 RV-A VP7 gene analysis demonstrated the existence of three main lineages: I, II, and III; all Brazilian strains and three porcine strains from Thailand grouped inside Lineage I. The VP8' subunit of VP4 gene showed that all P[8] strains fell into three major genetic lineages: P[8]-1; P[8]-2; and P[8]-3. Partial sequencing and phylogenetic analysis of VP1, VP2 and VP3 genes of P[8]G5 human RV-A strains were determined from 28 Brazilian strains collected from 1986 to 2005. The VP1-VP3 partial sequences analysis showed that the Brazilian strains have high amino acid identity with the human RV-A prototype IAL28 and other Wa-like genogroup strains. It was also shown that G5 RV-A Brazilian VP1-VP3 and VP7 sequences have a similar pattern of grouping: The study strains and the G5 prototype strain IAL-28 grouped together, while other prototypes, like OSU grouped separately. These results suggest that the core protein genes (VP1-VP3) of the G5 RV-A Brazilian strains might have originated from porcine and human strains. Phylogenetic analyses of VP7, VP4, VP1, VP2, and VP3 genes of P[8]G5 strains revealed a conserved genomic constellation (G5-P[8]-R1-C1-M1) with sequence similarity to Wa-like strains: IAL28, Wa, BE00048, CK00032, CK00033, DC4772 and DC1898, suggesting that despite the differences in genotypes (i.e., G5, G1 and G3) these viruses are genetically similar. The results presented here are fundamental to understand the epidemiology and evolution of genotype G5 RV-A and demonstrate the importance of continuous monitoring and molecular characterization of RV-A strains circulating in human and animal populations.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Group A rotaviruses (RV-A) are the most important etiological agent of severe diarrhea in infants and young children worldwide. Globally, approximately 511,000 children die every year from RV-A infection, and most deaths are in developing countries (Parashar et al., 2006). The Rotavirus genus is divided into seven groups (A–G), with RV-A the most prevalent. RV-A has a binary classification system based on genotyping of the outer capsid proteins, VP7 and VP4, with at least 27 G genotypes and 35 P genotypes, respectively described (Matthijnssens et al., 2011). Matthijnssens et al. (2008b) proposed a new classification system for RV-A, based on the molec-

ular properties of all 11 RV-A gene segments. Phylogenetic analyses suggest that the molecular characteristics of VP1, VP2, VP3, VP6, NSP1, NSP2, NSP3, NSP4 and NSP5 genes result in 9, 9, 8, 16, 16, 9, 12, 14 and 11 genotypes, respectively. The authors propose that the novel genotyping classification system allows a more systematic approach for investigating possible genetic linkages among RV-A genome segments. In addition, this system revealed a possible common origin of animal and human RV-A strains.

Epidemiological surveillance studies showed that strains bearing G1, G2, G3, G4, G9, P[4] and P[8] genotypes, are the most prevalent cause of RV-A associated gastroenteritis in humans worldwide (Gentsch et al., 2005; Santos and Hoshino, 2005; Leite et al., 2008; Matthijnssens et al., 2008a, 2009). Nonetheless, other genotypes, some of them resembling animal RV-A, are emerging as important agents of human disease in certain geographical regions. Recent reports are showing that RV-A genotype G5, previously detected only in South America, is now present in countries of Africa and Asia (Ahmed et al., 2007; Chan-It et al., 2008; Duan et al., 2007;

\* Corresponding author at: Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental, Pav. Hélio & Peggy Pereira, Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Av. Brasil 4365, 21040-360, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. Tel.: +55 2125621817; fax: +55 2125621851. E-mail address: [marcelle@ioc.fiocruz.br](mailto:marcelle@ioc.fiocruz.br) (M.F.M. da Silva).



Esona et al., 2004, 2009, 2010), suggesting that RV-A G5 strains are spreading around the world. However, beyond the genes encoding the outer capsid proteins, little is known about the other genes from G5 RV-A. In a previous study, Silva et al. (2011) described the phylogenetic analysis of the VP7 and VP4 genes from G5 RV-A Brazilian strains. VP7 gene analysis demonstrated the existence of the main lineages: (a) lineage I: grouping all Brazilian strains and three porcine strains from Thailand; (b) lineage II: animal strains from different regions; and (c) lineage III: human strains from Asia and Africa, and two porcine strains from Argentina. The VP8\* subunit of VP4 gene sequence analysis showed that all P[8] strains fell into three major genetic lineages: P[8]-1; P[8]-2; and P[8]-3. These results suggest that the RV-A G5 strains circulating in humans are the result of two independent zoonotic transmission events, most likely from pigs.

In the present study, the genetic variation through sequence analysis and phylogenetic reconstruction of three RV-A genes coding VP1, VP2, and VP3 proteins from the twenty-eight RV-A genotype G5 strains circulating in Brazil between 1986 and 2005 was conducted. VP1 is the viral RNA dependent RNA polymerase (RdRp) that functions as viral transcriptase and replicase (Estes and Kapikian, 2007); VP2 surrounds the dsRNA genome and is also essential for replicase activity and virus like particles (VLPs) formation (Zeng et al., 1998; Estes and Kapikian, 2007); and VP3 acts as guanylyl-transferase and methyltransferase (Subodh et al., 2006; Estes and Kapikian, 2007). The results of this study may help to understand how RV-A evolve and to measure how genetic diversity might affect the G5 RV-A strains circulation.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Study population

Twenty-eight stool specimens genotyped as P[8]G5 were collected between 1986 and 2005 from children with acute diarrhea in public or in private hospitals in the States of Rio de Janeiro, São Paulo, Minas Gerais, and the Federal District of Brazil. The nucleotide sequence data reported in this study was submitted to GenBank under the accession numbers: GQ337989–GQ338016 (VP1 gene), GQ338017–GQ338044 (VP2 gene), and GQ338045–GQ338072 (VP3 gene). This study was approved by the Institutional Ethics Committee (CEP/FIOCRUZ), number 311/2006.

### 2.2. Nucleic acid extraction, VP1, VP2, and VP3 gene amplification and nucleotide sequencing

Viral dsRNA was extracted by the glass powder method (Boom et al., 1990). Reverse transcription (RT) was performed and the VP1, VP2, and VP3 genes were amplified according to Varghese et al. (2006) using gene specific primers. The primers used for partial amplification of VP1 and VP2 genes were designed to generate a 686 bp amplicon at the 5' terminus of the gene (nucleotide position 1–686 in both genes). Similarly the primers used for amplification of partial VP3 genes were designed to generate an amplicon of 702 bp from the 5' terminus of the gene (nucleotide position 1–702) (Varghese et al., 2006).

The same primers used in the RT-PCR procedure were employed individually for gene sequencing. Forward and reverse strand sequence analysis was carried out, at least twice, for each VP1, VP2, and VP3 sequence. DNA sequencing was performed using ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit® and an ABI Prism 3730 Genetic Analyzer® (both from Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) by Genomic DNA sequencing Platform PDTIS/FIOCRUZ. All procedures were performed including

negative controls (DNase/RNase free water – Gibco, Grand Island, USA – with RNaseOut – Invitrogen, Carlsbad, USA) during all steps, and all reactions were repeated at least once for the accuracy of the test.

### 2.3. Phylogenetic analysis

The sequences were aligned using the CLUSTAL W program (Thompson et al., 1994). Phylogenetic and genetic distance analyses were performed using MEGA v.4.0 software package (Tamura et al., 2007). Tree reconstructions were performed by the neighbor-joining (NJ) method, based on the Kimura two-parameter model (Kimura, 1980). The robustness of each node was assessed by bootstrap resampling (2000 replicates). Nucleotide sequences used for phylogenetic analysis were obtained from the NCBI Database at the GenBank. However, the lack of different genes sequences corresponding to the same isolate in the GenBank database turned out difficult to perform the phylogenetic analysis with the three genes studied. The VP7 and VP4 phylogenetic analysis from the strains studied here were described previously by Silva et al. (2011).

### 2.4. Sequence identity study

Matrices based on the nucleotide and amino acid sequences identity were constructed using the BioEdit Program, version 7.0.9.0 (Hall, 1999). The nucleotide and amino acid sequences of VP1, VP2 and VP3 genes used for the matrix construction are available in the NCBI Database at the GenBank: IAL28: VP1 (EF583029), VP2 (EF583030) and VP3 (EF583031); Wa: VP1 (AF106300), VP2 (X14942) and VP3 (AY267335); BE00048: VP1 (HQ392410), VP2 (HQ392419) and VP3 (HQ392418); CK00032: VP1 (JF490380), VP2 (JF490390), and VP3 (JF490389); CK00033: VP1 (JF490391), VP2 (JF490401) and VP3 (JF490400); DC1898: VP1 (FJ947296), VP2 (FJ947297) and VP3 (FJ947298); DC4772: VP1 (FJ947362), VP2 (FJ947363) and VP3 (FJ947364); OSU: VP1 (GU199514), VP2 (GU199515) and VP3 (AY277921) and TUCH: VP1 (EF583010), VP2 (EF583011) and VP3 (EF583012).

## 3. Results

### 3.1. Analysis of VP1 gene

The phylogenetic analysis was based on the partial VP1 nucleotide sequence (686 bp). All Brazilian strains were classified as genotype R1 according to the new RV-A classification system (data not shown). Although all strains share the same genotype, genetic variability among Brazilian strains was observed. The Brazilian VP1 sequences are available in GenBank under the accession numbers: GQ337989–GQ338016. As can be seen in Fig. 1, strains collected between 1986 and 1996 grouped with the human prototype IAL28 (P[8]G5). Other strains, collected between 1998 and 2005, grouped into another cluster with human P[8]G1 prototypes: Wa, BE00048, CK00032 and CK00033 and P[8]G3 prototypes: DC4772 and DC1898. The analysis of VP1 amino acid sequences revealed maximum identity (100%) between Brazilian strains and human RV-A prototypes IAL28 and Wa. The studied strains, as well as the human RV-A prototypes were classified as belonging to Wa-like genogroup.

As evident in Fig. 1, some strains collected in the Federal District of Brazil, Minas Gerais, and São Paulo, in 1986, grouped together. One strain collected in Rio de Janeiro in 1996 (rj454/96), strains collected in Rio de Janeiro between 1998 and 2005 (rj1625/98, rj1713/98, rj1716/98, rj1719/98, rj1861/98, and rj10998/05) formed an individual cluster. As described before for VP7 gene (Silva et al., 2011), it was observed that the Brazilian VP1

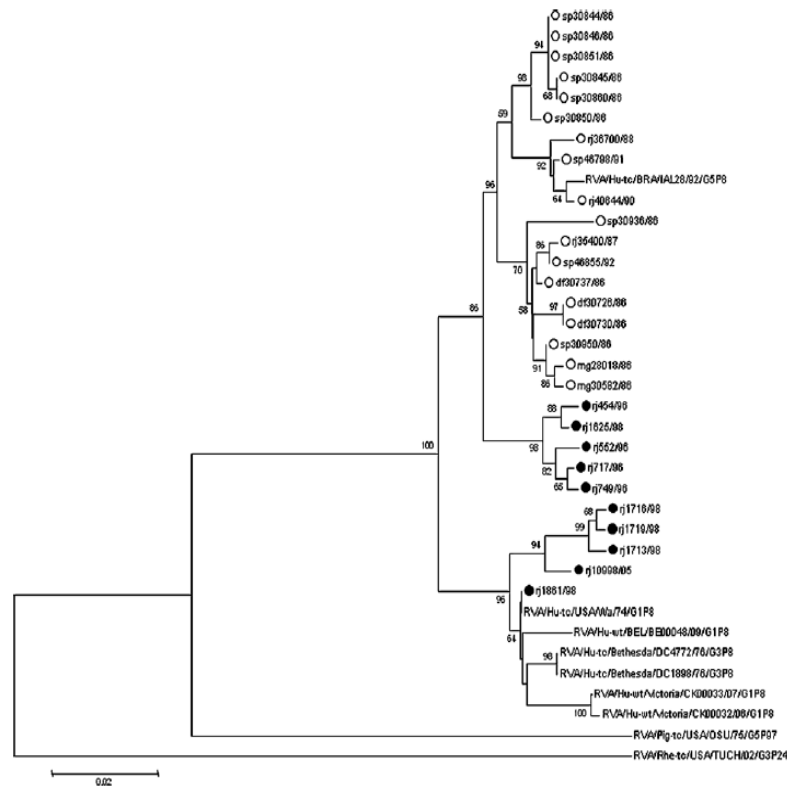


Fig. 1. VP1 phylogeny of rotavirus A strains. Bootstrap values (2000 replicates) are shown at the branch nodes, values lower than 50% are not shown. The scale bar at the bottom of the trees indicates distance. The strains in bold indicate the Brazilian P[8]G5 strains sequenced in this study. The strains marked with ○ were collected between 1986 and 1992 and the strains marked with ● were collected between 1996 and 2005.

sequences were grouped in the same root, whereas the remaining strains formed different clusters.

The alignment of the deduced VP1 gene amino acid sequences showed maximum identity to human RV-A IAL28 and Wa (96–100%) and lower identity to porcine RV-A OSU with 94–98% identity (Supplementary data). The analysis revealed substitutions in two strains collected in Minas Gerais (mg28018/86 and mg30582/86) and one collected in São Paulo (sp30950/86), in 1986, showed an amino acid substitution at position 50<sup>S→N</sup>; in the same position one strain collected in Rio de Janeiro in 1996 (rj454/96) and the strains collected in Rio de Janeiro between 1998 and 2005 showed the substitution 50<sup>S→G</sup>. Two strains collected in the Federal District of Brazil in 1986 (df30726/86 and df30730/86) showed amino acid substitutions at position 102<sup>V→I</sup>. In the same position six strains isolated in São Paulo in 1986 (sp30844/86, sp30845/86, sp30846/86, sp30851/86, sp30860/86 and sp30936/86) and the strains collected in Rio de Janeiro between 1998 and 2005 (rj1625/98, rj1713/98, rj1716/98, rj1719/98, rj1861/98, and rj10998/05) shared the substitution 10<sup>V→A</sup>. Some of the strains collected between 1986 and 2005 showed amino acid substitutions at positions 104<sup>E→D</sup>, 105<sup>L→I</sup> and 152<sup>A→N/T</sup> (Fig. 2).

### 3.2. Analysis of VP2 gene

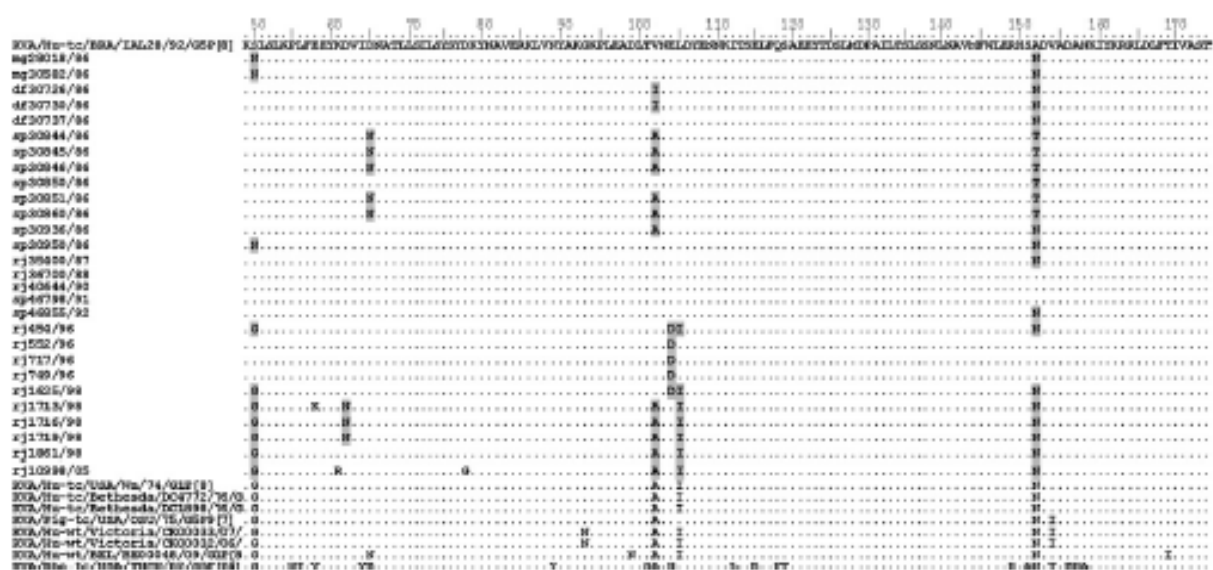
The phylogenetic analysis of VP2 was based in the partial nucleotide sequence (686 bp). All Brazilian strains were classified as genotype C1 according to the new RV-A classification system (data not shown). The Brazilian VP2 sequences are available in GenBank under the accession numbers: GQ338017–GQ338044. As seen for the VP1 gene sequences, the VP2 gene sequences showed genetic

variability grouping into different clusters (Fig. 3). Strains collected between 1986 and 1992 grouped in a cluster with the human Brazilian prototype IAL28 and the strains collected between 1996 and 2005 grouped in a different cluster. As described for VP7 gene (Silva et al., 2011), it was observed that the Brazilian VP2 sequences were grouped in the same root, whereas the remaining strains formed distinct clusters.

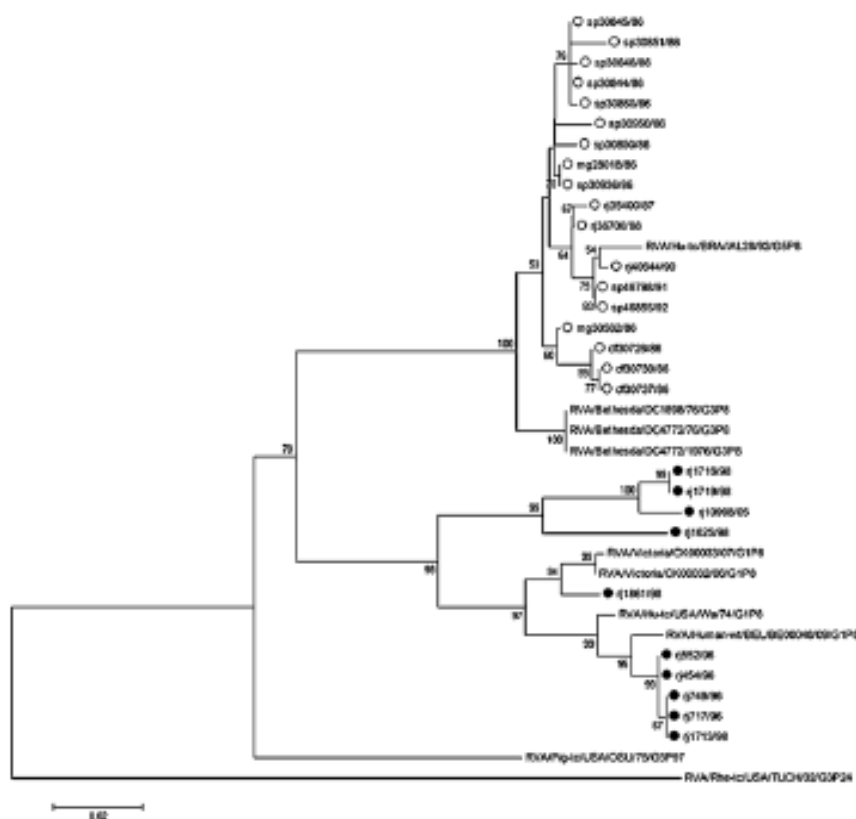
Comparison of the deduced partial VP2 Brazilian amino acid sequences showed maximum amino acid identity (94–100%) with the human G5 RV-A prototype IAL28 and 93–99% with the human prototype Wa. The VP2 protein sequences had lower amino acid identity compared to the porcine RV-A prototype OSU with 90–93% (Supplementary data).

The alignment of the deduced amino acid sequences from VP2 gene revealed amino acid substitutions in the Brazilian strains. Several non-synonymous substitutions were detected in the sequences in positions: 14<sup>L→P</sup>, insertion of a glutamic acid (E) at position 23 of the three strains collected in the Federal District in 1986; three collected in Rio de Janeiro in 1987, 1988 and 1990 (rj35400/87, rj36700/87 and rj40644/90) and two collected in São Paulo in 1991 and 1992 (sp46798/91 and sp46855/92). The strains collected in the Federal District showed a substitution at position 38<sup>A→S</sup> and at the same position strains collected in Rio de Janeiro between 1996 and 2005 shared the substitution 38<sup>A→N</sup>. At the position 70 the strains collected in the Federal District showed the substitution 70<sup>L→V</sup>. All strains collected between 1996 and 2005 showed specific substitutions at the positions 14<sup>L→P</sup>, 38<sup>A→N</sup>, 40<sup>S→N</sup>, 41<sup>K→R</sup>, 56<sup>V→I</sup>, 64<sup>V→I</sup> and 129<sup>T→M</sup>. Other amino acid substitutions were found at positions: 12<sup>N→S</sup>, 2<sup>N→D</sup>, 60<sup>A→V</sup>, 68<sup>D→G</sup>, 9<sup>V→I</sup>, 117<sup>I→L</sup>, 13<sup>K→R</sup> and 149<sup>R→K</sup> (Fig. 4).

Please cite this article in press as: da Silva, M.F.M., et al., Phylogenetic analysis of VP1, VP2, and VP3 gene segments of genotype G5 group A rotavirus strains circulating in Brazil between 1986 and 2005. *Virus Res.* (2011), doi:10.1016/j.virusres.2011.07.015



**Fig. 2.** Alignment of VP1 amino acid sequences from rotavirus A genotype P[8]G5 strains isolated in Brazil with prototypes rotaviruses A strains. Strains are shown by name at the left side of the figure. Identity to strain IAL28 is shown by a dot. Amino acids are denoted by a one-letter abbreviation. Numbers at the top of each alignment denote amino acid positions. The figure shows the regions of the alignment that have specific amino acid substitutions of the Brazilian genotype P[8]G5 strains denoted by a gray column.

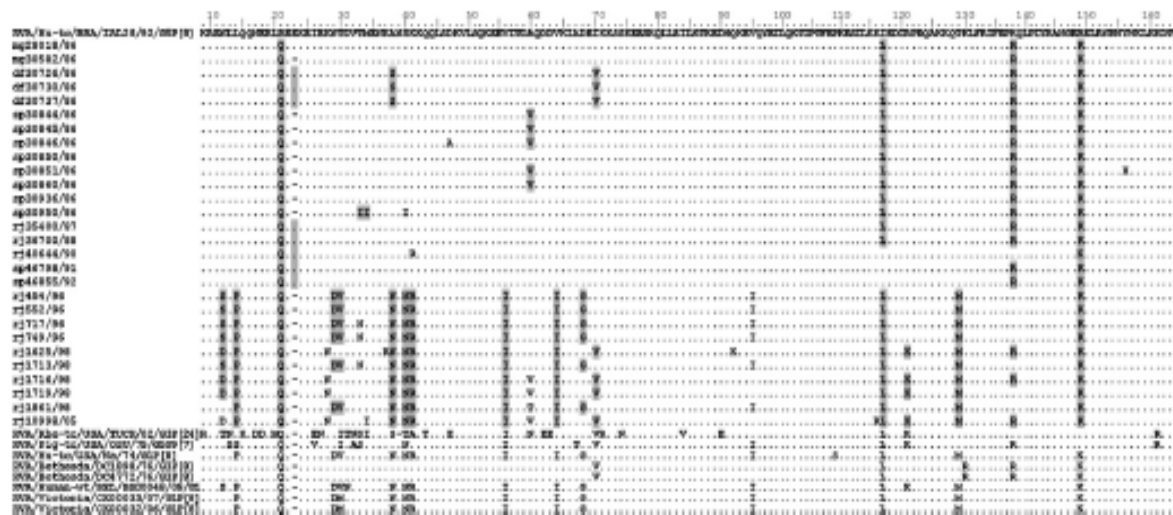


**Fig. 3.** VP2 phylogeny of rotavirus A strains. Bootstrap values (2000 replicates) are shown at the branch nodes, values lower than 50% are not shown. The scale bar at the bottom of the trees indicates distance. The strains in bold indicate the Brazilian P[8]G5 strains sequenced in this study. The strains marked with ○ were collected between 1985 and 1992 and the strains marked with ● were collected between 1996 and 2005.

### 3.3. Analysis of VP3 gene

The phylogenetic analysis of VP3 was based in the partial nucleotide sequence (702 bp). All Brazilian strains were classified

as genotype M1, according to the new RV-A classification system (data not shown). Despite all strains having the same genotype, a genetic variability among them could be observed. The Brazilian VP3 sequences are available in GenBank under the accession

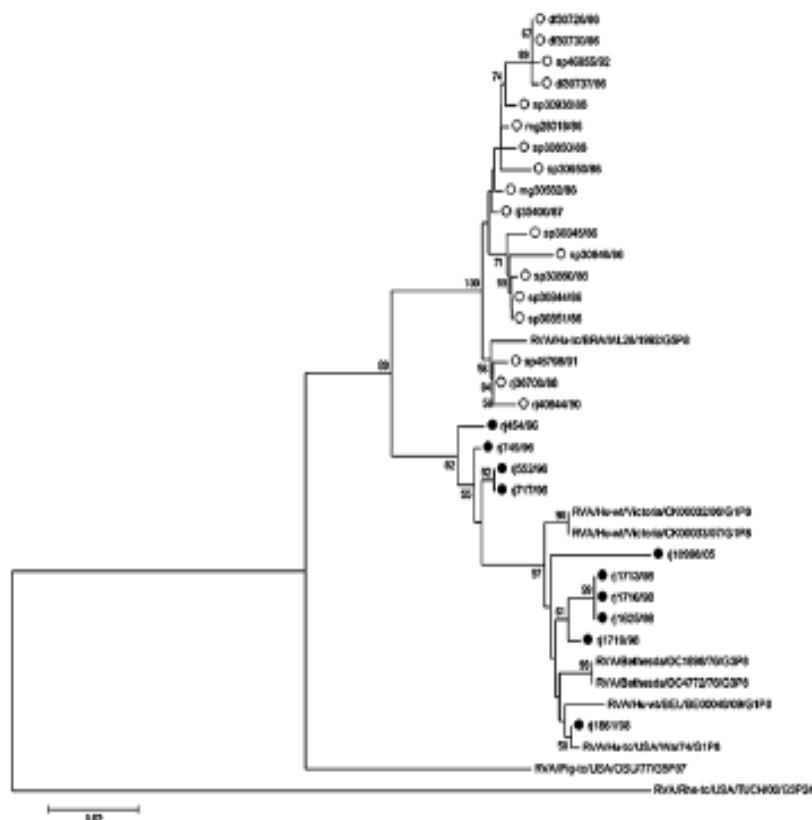


**Fig. 4.** Alignment of VP2 amino acid sequences from rotavirus A genotype P[8]G5 strains isolated in Brazil with prototypes rotaviruses A strains. Strains are shown by name at the left side of the figure. Identity to strain IAL28 is shown by a dot. Amino acids are denoted by a one-letter abbreviation. Numbers at the top of each alignment denote amino acid positions. The figure shows the regions of the alignment that have specific amino acid substitutions of the Brazilian genotype P[8]G5 strains denoted by a gray column.

numbers: GQ338045–GQ338072. As can be seen in Fig. 5, some strains collected in 1986 and 1992 grouped in a cluster with the human RV-A prototype IAL28. Strains collected between 1996 and 2005 grouped into another cluster, with the human G1P[8] prototypes Wa, CK00032, CK00033 and BE00048 and the human G3P[8] prototypes DC1898 and DC4772. As described for VP7 gene (Silva

et al., 2011), it was observed that the Brazilian VP3 sequences were grouped in the same root, whereas the porcine RV-A G5 prototype OSU formed a distinct cluster.

Comparison of the deduced partial VP3 protein sequences showed maximum amino acid identity (97–99%) between the Brazilian strains and the RV-A prototype IAL28 and 95–99% with



**Fig. 5.** VP3 phylogeny of rotavirus A strains. Bootstrap values (2000 replicates) are shown at the branch nodes, values lower than 50% are not shown. The scale bar at the bottom of the trees indicates distance. The strains in bold indicate the Brazilian P[8]G5 strains sequenced in this study. The strains marked with ○ were collected between 1986 and 1992 and the strains marked with ● were collected between 1996 and 2005.

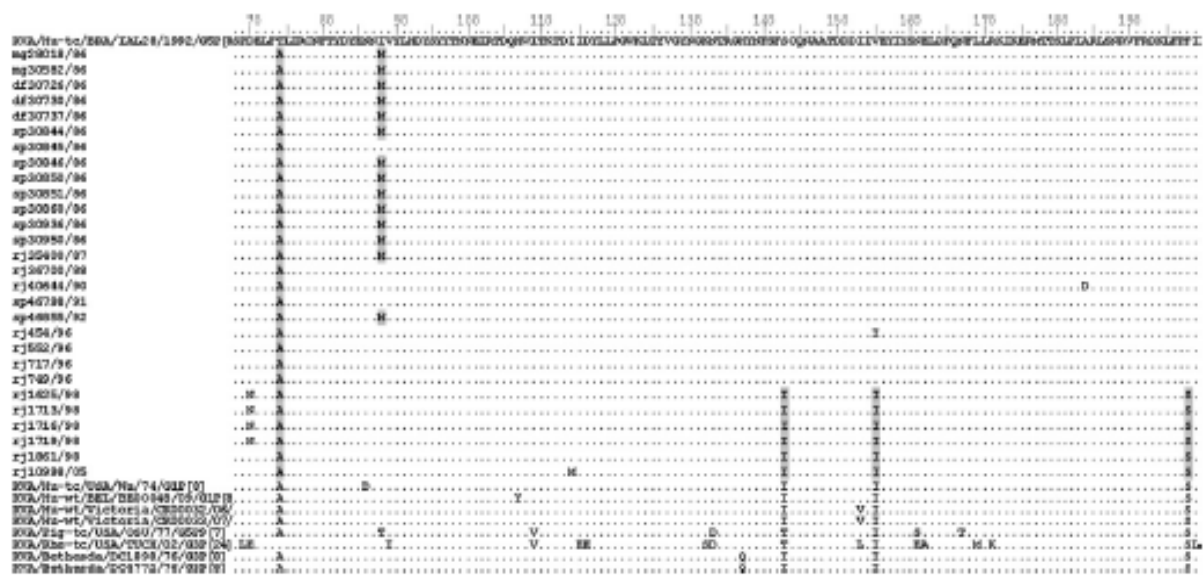


Fig. 6. Alignment of VP3 amino acid sequences from rotavirus A genotype P[8]G5 strains isolated in Brazil with prototypes rotaviruses A strains. Strains are shown by name at the left side of the figure. Identity to strain IAL28 is shown by a dot. Amino acids are denoted by a one-letter abbreviation. Numbers at the top of each alignment denote amino acid positions. The figure shows the regions of the alignment that have specific amino acid substitutions of the Brazilian genotype P[8]G5 strains denoted by a gray column.

the prototype Wa. The VP3 protein sequences had lower identity to the porcine RV-A prototype OSU with 92–95% (Supplementary data).

The alignment of the deduced amino acid sequences of VP3 gene revealed few amino acid substitutions in the Brazilian strains. All strains shared a T→A substitution at position 74 and some strains collected between 1986 and 1992 showed a I→M substitution at position 88. The strains collected between 1998 and 2005 shared specific substitutions at positions 143<sup>S→I</sup>, 155<sup>V→I</sup> and 198<sup>I→S</sup> (Fig. 6).

#### 4. Discussion and conclusion

There are few data showing the molecular characterization of VP1, VP2, and VP3 sequences from G5 RV-A. It is known that protein VP1 has an activity of replicase and transcriptase, catalyzing the formation of the dsRNA (Heiman et al., 2008). It was also described that among the core proteins, VP1 is the only one that has a sequence-specific recognition of viral RNA through conserved regions of four bases, UGUG in its 3' sequence (Lu et al., 2008), but it is not known which regions of the sequence of VP1 is responsible for this specific recognition, as well as the motifs involved in the protein–protein interaction (Vasquez-del Carpio et al., 2006).

The partial VP1 Brazilian G5 RV-A sequences exhibited highest identity to human RV-A strains and clustered together with human RV-A prototype like IAL28 and Wa. The VP1 phylogenetic analysis showed that Brazilian strains grouped together with bootstrap value of 100%. Interestingly, strains collected between 1986 and 1996, and a strain collected in Rio de Janeiro in 1998 (rj1625/98) were closely related to with the human Brazilian prototype IAL28. On the other hand, strains collected between 1998 and 2005 grouped closest to the human RV-A prototypes Wa, BE00048 and DC4772 (Fig. 1).

The VP1 comparative analysis demonstrates the existence of non-synonymous substitutions at certain amino acid positions in the group of strains from the same period (strains collected between 1986 and 1996; strains collected between 1998 and 2005) (Fig. 2). These results suggest the existence of some temporal order genetic differentiation on the VP1 gene sequences.

It was reported that VP2 plays a key role in the structure and activity of the viral core, as it interacts with trimers of VP6 protein, which surrounds the viral core, transporting metabolites and mRNA during transcription. In addition, VP2 is part of the viral replication complex and binds to both, VP1 and VP3 through an area in its N-terminal portion. The VP2–VP1–VP3 interaction is critical for replication and transcription of the viral genome (Heiman et al., 2008).

Analyzing the partial VP2 sequences of G5, was observed that all belonged to genotype C1 based on the new classification system for RV-A and suggest that all strains have human origin. The phylogenetic analysis showed the existence of three clusters: (a) strains collected by the year 1992 and the human prototype IAL28. According to Leite et al. (2008) these strains belong to the first pre-vaccination period; (b) four strains collected during the period between 1998 and 2005 (second pre-vaccination period) grouped together: rj1625/98, rj1719/98, rj1719/98 and rj10998/05; (c) six strains collected between 1996 and 1998 in Rio de Janeiro (rj454/96, rj552/96, rj717/96, rj749/96, rj1713/98, rj1861/98) and human prototypes CK00032, CK00033 and BE00048 (Fig. 3).

It is also demonstrated that in VP2 sequences obtained from strains collected in the Federal District in 1986 (df30726/86, df30730/86, and df30737/86), three strains collected in Rio de Janeiro in 1987, 1988 and 1990 (rj35400/87, rj36700/88 and rj40644/90, respectively) and two samples collected in São Paulo (sp46798/91 and sp46855/92) it was detected the occurrence of a glutamic acid (E) substitution at position 23 of the amino acid sequences (within the binding domain of the nucleic acid), confirming reports of Heiman et al. (2008) where the occurrence of insertions/deletions regions are demonstrated in the initial portion of VP2 sequences of prototypes from different origins and genotypes (Fig. 4).

Although the VP3 protein activity in the viral morphogenesis has not been fully elucidated yet, several studies have demonstrated its guanylyl methyltransferase activity (Fresco and Buratowski, 1994; Patton, 1995; Subodh et al., 2006). Like the VP1 gene phylogenetic analysis, the VP3 phylogenetic analysis showed the existence of two different clusters: (a) strains collected by the year 1992 with the human Brazilian prototype IAL28; (b) strains collected between

1998 and 2005 and human prototypes Wa, CK00032, CK00033, BE00048, DC1898 and DC4772.

The VP3 comparative alignment analysis demonstrates the existence of non-synonymous substitutions in various positions of the gene, as well as replacements at positions 74<sup>T→A</sup>, 143<sup>S→I</sup> and 155<sup>V→I</sup> in the strains collected between 1998 and 2005 (Fig. 6). These results suggest the existence of some temporal order genetic differentiation, as a molecular signature, between these VP3 Brazilian sequences. As discussed by Heiman et al. (2008), the VP3 amino acid strains showed more genotype-specific differences than any other inner capsid protein.

In a previous study, Silva et al. (2011) sequenced and compared the VP7 and VP4 genes of these Brazilian G5 RV-A with other strains circulating worldwide in animals and humans to evaluate the evolutionary relationship among RV-A G5 strains. The VP7 gene phylogenetic analysis demonstrated the existence of three main lineages and showed that all Brazilian strains grouped in Lineage I. The VP8<sup>7</sup> subunit of VP4 gene sequencing showed that all P[8] strains fell into three major genetic lineages: P[8]-1; P[8]-2; and P[8]-3. These results showed that the RV-A G5 strains circulating in humans are the result of two independent zoonotic transmission events, most likely from pigs.

Our analysis indicates that there is a genetic relationship among VP1, VP2 and VP3 genes from human and porcine RV-A strains. Similarly, Alfieri et al. (1996) reported the genetic relationships of P[8]G5 Brazilian strains to other RV-A genogroups by RNA-RNA hybridization with [<sup>32</sup>P]-GTP probes representing human (Wa and AU17) and porcine (OSU) RV-A prototypes. The hybrids obtained with the [<sup>32</sup>P]-GTP probe analysis indicated a close relationship between the VP1, VP2 and VP3 genes from human and porcine RV-A prototypes.

Similar to that previously described for the VP7 gene analysis (Silva et al., 2011), VP1, VP2, and VP3 phylogenetic analysis revealed a distinct pattern in the Brazilian strains. The Brazilian G5 RV-A strains, including the IAL28 prototype, formed a distinct cluster from the other RV-A prototypes circulating worldwide in all studied proteins, which tended to group in different clusters. Brazilian strains collected between 1986 and 1992 grouped with the human Brazilian prototype IAL28 and strains collected between 1996 and 2005 grouped with other human prototypes, Wa, CK00032, CK00033, BE00048, DC1898 and DC4772. The phylogenetic analysis of VP7, VP4, VP1, VP2, and VP3 genes of P[8]G5 Brazilian strains revealed a conserved genomic constellation (G5-P[8]-R1-C1-M1) with sequence similarity to Wa-like genogroup strains: IAL28, Wa, OSU, CK00032, CK00033, BE00048, DC1898 and DC4772. These findings indicate that the G5 Brazilian VP1, VP2 and VP3 genes might have evolved gradually from porcine to human strains, despite the differences in genotype specificities (i.e., G1, G5 and G4) with a single genogroup (Wa-like), suggesting that they are genetically linked.

The potential effect of new RV-A variants, as well as possible antigenic changes resulted from accumulated genetic mutations, can avoid changes and even loss of effectiveness of vaccines against RV-A. Therefore, as recommended by the World Health Organization, the monitoring of genetic diversity among RV-A strains is vital to predict possible reemergence of strains, such as genotype G5, and the emergence of new genotypes as G8 (Gómez et al., 2010) and G12 (Castello et al., 2009) after the introduction of a vaccine against RV-A in the different continents.

#### Acknowledgements

We would like to thank Alexandre Madi Fialho for technical assistance, Dr. Vici Varghese for providing VP1–VP3 protocols, mothers who agreed that their children participate in this study

and the private and state hospitals for providing samples for the development of this study. This research was supported by federal funds from the Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education (CAPES), the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Oswaldo Cruz Institute, PapesV/FIOCRUZ – CNPq, the General Coordination of Public Health Laboratories – Secretary of Health Surveillance (CGLAB/SVS), Ministry of Health, and the Carlos Chagas Filho Foundation for Research Support of Rio de Janeiro State (FAPERJ).

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.virusres.2011.07.015.

#### References

- Ahmed, K., Anh, D.D., Nakagomi, O., 2007. Rotavirus G5P[6] in child with diarrhea, Vietnam. *Emerg. Infect. Dis.* 13 (8), 1232–1235.
- Alfieri, A., Leite, J., Nakagomi, O., Kaga, E., Woods, P., Glass, R., Gentsch, J., 1996. Characterization of human rotavirus genotype P[8]G5 from Brazil by probe-hybridization and sequence. *Arch. Virol.* 141 (12), 2353–2364.
- Boom, R., Sol, C.J., Salimans, M.M., Jansen, C.L., Wertheim-van Dillen, P.M., van der Noordaa, J., 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* 28 (3), 495–503.
- Castello, A.A., Nakagomi, T., Nakagomi, O., Jiang, B., Kang, J.O., Glass, R.L., Glikmann, G., Gentsch, J., 2009. Characterization of genotype PG12 rotavirus strains from Argentina: high similarity with Japanese and Korean G12 strains. *J. Med. Virol.* 81 (February (2)), 371–381.
- Chan-It, W., Khamrin, P., Saekhow, P., Pantip, C., Thongprachum, A., Peerakome, S., Ushijima, H., Maneekarn, N., 2008. Multiple combinations of P[13]-like genotype with G3, G4, and G5 in porcine rotaviruses. *J. Clin. Microbiol.* 46 (4), 1169–1173.
- Duan, Z.J., Li, D.D., Zhang, Q., Liu, N., Huang, C.P., Jiang, X., Jiang, B., Glass, R., Steele, D., Tang, J.Y., Wang, Z.S., Fang, Z.Y., 2007. Novel human rotavirus of genotype G5P[6] identified in a stool specimen from a Chinese girl with diarrhea. *J. Clin. Microbiol.* 45 (5), 1614–1617.
- Esona, M.D., Armah, G.E., Geyer, A., Steele, A.D., 2004. Detection of an unusual human rotavirus strain with G5P[8] specificity in a Cameroonian child with diarrhea. *J. Clin. Microbiol.* 42 (1), 441–444.
- Esona, M.D., Geyer, A., Banyai, K., Page, N., Aminu, M., Armah, G.E., Hull, J., Steele, D.A., Glass, R.L., Gentsch, J.R., 2009. Novel human rotavirus genotype G5P[7] from child with diarrhea, Cameroon. *Emerg. Infect. Dis.* 15 (1), 83–86.
- Esona, M.D., Mijatovic-Rustempasic, S., Conrardy, C., Tong, S., Kuzmin, I.V., Agwanda, B., Breiman, R.F., Banyai, K., Niezgodna, M., Rupprecht, C.E., Gentsch, J.R., Bowen, M.D., 2010. Reassortant group A rotavirus from straw-colored fruit bat (*Eidolon helvum*). *Emerg. Infect. Dis.* 16 (December (12)), 1844–1852.
- Estes, M.K., Kapikian, A.Z., 2007. Rotaviruses. In: Knipe, D.M., Howley, P.M., Griffin, D.E. (Eds.), *Fields Virology*, 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 1917–1975.
- Fresco, L.D., Buratowski, S., 1994. Active site of the mRNA-capping enzyme guanylyltransferase from *Saccharomyces cerevisiae*: similarity to the nucleotidyl attachment motif of DNA and RNA ligases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 6624–6628.
- Gentsch, J.R., Laird, A.R., Bielfelt, B., Griffin, D.D., Banyai, K., Ramachandran, M., Jain, V., Cunliffe, N.A., Nakagomi, O., Kirkwood, C.D., Fischer, T.K., Parashar, U.D., Breesee, J.S., Jiang, B., Glass, R.L., 2005. Serotype diversity and reassortment between human and animal rotavirus strains: implications for rotavirus vaccine programs. *J. Infect. Dis.* 192, S146–S159.
- Gómez, M.M., Volotão, E.M., Mendonça, M.C.L., Tort, L.F.L., Silva, M.F.M., Leite, J.P.G., 2010. Detection of uncommon rotavirus A strains PG8 and PG8 in the city of Rio de Janeiro, 2002. *J. Med. Virol.* 82 (7), 1272–1276.
- Hall, T., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids Symp. Ser.* 41, 95–98.
- Heiman, E.M., McDonald, S.M., Barro, M., Taraporewala, Z.F., Bar-Magen, T., Patton, J.T., 2008. Group A human rotavirus genomics: evidence that gene constellations are influenced by viral protein interactions. *J. Virol.* 82, 11106–11116.
- Kimura, M.A., 1980. Simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16, 111–120.
- Leite, J.P., Carvalho-Costa, F.A., Linhares, A.C., 2008. Group A rotavirus genotypes and the ongoing Brazilian experience: a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 103 (8), 745–753.
- Lu, X., McDonald, S.M., Tortorici, M.A., Tao, Y.J., Vasquez-Del Carprio, R., Nibert, M.L., Patton, J.T., Harrison, S.C., 2008. Mechanism for coordinated RNA packaging and genome replication by rotavirus polymerase VP1. *Structure* 16, 1678–1688.
- Matthijssens, J., Ciarlet, M., Heiman, E., Arijs, I., Delbeke, T., McDonald, S.M., Palombo, E.A., Iturriza-Gomara, M., Maes, P., Patton, J.T., Rahman, M., Van Ranst, M., 2008a. Full genome-based classification of rotaviruses reveals a common origin between human Wa-Like and porcine rotavirus strains and human DS-1-like and bovine rotavirus strains. *J. Virol.* 82 (7), 3204–3219.

Please cite this article in press as: da Silva, M.F.M., et al., Phylogenetic analysis of VP1, VP2, and VP3 gene segments of genotype G5 group A rotavirus strains circulating in Brazil between 1986 and 2005. *Virus Res.* (2011). doi:10.1016/j.virusres.2011.07.015

- Matthijssens, J., Ciarlet, M., Rahman, M., Attoui, H., Bányai, K., Estes, M.K., Gentsch, J.R., Iturriza-Gómara, M., Kirkwood, C.D., Martella, V., Mertens, P.P., Nakagomi, O., Patton, J.T., Ruggeri, F.M., Saif, L.J., Santos, N., Steyer, A., Taniguchi, K., Desselberger, U., Van Ranst, M., 2008b. Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. *Arch. Virol.* 153 (8), 1621–1629.
- Matthijssens, J., Bilcke, J., Ciarlet, M., Martella, V., Bányai, K., Rahman, M., Zeller, M., Beutels, P., Van Damme, P., Van Ranst, M., 2009. Rotavirus disease and vaccination: impact on genotype diversity. *Future Microbiol.* 4 (December), 1303–1316.
- Matthijssens, J., Ciarlet, M., McDonald, S.M., Attoui, H., Bányai, K., Brister, J.R., Buesa, J., Esona, M.D., Estes, M.K., Gentsch, J.R., Iturriza-Gómara, M., Johne, R., Kirkwood, C.D., Martella, V., Mertens, P.P., Nakagomi, O., Parreño, V., Rahman, M., Ruggeri, F.M., Saif, L.J., Santos, N., Steyer, A., Taniguchi, K., Patton, J.T., Desselberger, U., Van Ranst, M., 2011. Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). *Arch. Virol.* May 20 (Epub ahead of print).
- Parashar, U.D., Gibson, C.J., Bresse, J.S., Glass, R.I., 2006. Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerg. Infect. Dis.* 12, 304–306.
- Patton, J.T., 1995. Structure and function of the rotavirus RNA-binding proteins. *J. Gen. Virol.* 6 (Pt 11), 2633–2644.
- Santos, N., Hoshino, Y., 2005. Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *Rev. Med. Virol.* 15 (1), 29–56.
- Silva, M.F.M., Tort, L.F.L., Gómez, M.M., Assis, R.M., Volotão, E.M., Mendonça, M.C.L., Bello, G., Leite, J.P.G., 2011. VP7 gene of human rotavirus A genotype G5: phylogenetic analysis reveals the existence of three different lineages worldwide. *J. Med. Virol.* 83 (February (2)), 357–366.
- Subodh, S., Bhan, M.K., Ray, P., 2006. Genetic characterization of VP3 gene of group A rotaviruses. *Virus Genes* 33 (2), 143–145.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24 (8), 1596–1599.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22 (22), 4673–4680.
- Varghese, V., Ghosh, S., Das, S., Bhattacharya, S.K., Krishnan, T., Karmakar, P., Kobayashi, N., Naik, T.N., 2006. Characterization of VP1, VP2 and VP3 gene segments of a human rotavirus closely related to porcine strains. *Virus Genes* 32 (3), 241–247.
- Vasquez-del Carpio, R., Morales, J.L., Barro, M., Ricardo, A., Spencer, E., 2006. Bioinformatic prediction of polymerase elements in the rotavirus VP1 protein. *Biol. Res.* 39 (4), 649–659.
- Zeng, C.Q., Estes, M.K., Charpilienne, A., Cohen, J.J., 1998. The N terminus of rotavirus VP2 is necessary for encapsidation of VP1 and VP3. *J. Virol.* 72 (1), 201–208.

## **CAPITULO III**

**ANÁLISE FILOGENÉTICA DO GENE QUE CODIFICA PARA  
A PROTEÍNA VP8\* DE CEPAS DE RVA DE GENÓTIPO P[8]  
CIRCULANDO NO BRASIL ENTRE 1986 E 2011**

**(ARTIGO 3)**



**Artigo 3:** Linhagens de P[8] VP8\* de rotavirus A circulando no Brasil por mais de 20 anos no Brasil: Proposta de seis sublinhagens diferentes para a linhagem P[8]-3.

**Publicado em:** Infection, genetics and evolution

**Fator de impacto:** 2.768

**Resumo:** Neste estudo foi realizada a análise filogenética do gene que codifica para a proteína VP8\* de cepas brasileiras de genótipo P[8] associado a diferentes genótipos G (G1, G3, G5 e G9) que circularam no país entre 1986 e 2011. Os resultados demonstraram que circularam no Brasil três linhagens de P[8] (P[8]-1, P[8]-2 e P[8]-3) no período analisado, com a cocirculação de linhagens em alguns anos, como P[8]-1, P[8]-2 e P[8]-3 em 2001. A grande variabilidade encontrada na linhagem P[8]-3 possibilitou a proposta de uma classificação em 6 sublinhagens: P[8]-3.1 – P[8]-3.6.

# VP8\*P[8] lineages of group A rotaviruses circulating over 20 years in Brazil: Proposal of six different sub-lineages for P[8]-3 clade

Marcelle Figueira Marques da Silva<sup>a,\*</sup>, Mariela Martínez Gómez<sup>a</sup>, Tatiana Lundgren Rose<sup>a</sup>, Eduardo de Mello Volotão<sup>a</sup>, Filipe Anibal Carvalho-Costa<sup>a</sup>, Gonzalo Bello<sup>b</sup>, Jose Paulo Gagliardi Leite<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratory of Comparative and Environmental Virology, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Ministry of Health, Av. Brasil 4365, Manguinhos, 21040-360 Rio De Janeiro, RJ, Brazil

<sup>b</sup>Laboratory of AIDS and Molecular Immunology, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Ministry of Health, Av. Brasil 4365, Manguinhos, 21040-360 Rio De Janeiro, RJ, Brazil

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 28 September 2012

Received in revised form 29 November 2012

Accepted 2 January 2013

Available online 24 January 2013

### Keywords:

Gastroenteritis

Group A rotavirus

Phylogenetic analysis

P[8]lineages

P[8]-3 sub-lineages

## ABSTRACT

Group A rotaviruses (RVA) is the most important cause of severe gastroenteritis among children worldwide. Vaccination is considered the best alternative among public health measures to reduce and prevent the global burden caused by RVA infections. Rotarix™, a monovalent vaccine based on a human strain with a G1P[8]-1 specificity, was introduced in the National Brazilian Immunization Programs (NIP) in March, 2006. RVA P[8] is the most prevalent P genotype worldwide and four distinct phylogenetic lineages: P[8]-1, -2, -3, and -4 have been described. In the current study phylogenetic analysis of the VP8\* gene of 135 RVA P[8] Brazilian strains, in combination with G1, G3, G5 or G9 VP7 genotype, collected from 1986 to 2011 were carried out for a better understanding of the evolution of this viral genotype in Brazil. Lineages P[8]-1, P[8]-2, and P[8]-3 were observed circulating in Brazil. In 2001 these three P[8] lineages co-circulated simultaneously and this is the first report in South America to date. Considering the P[8] lineage and the G genotype, all G3 strains were related to lineage P[8]-3, whereas the G9 strains were related to P[8]-2 and P[8]-3 and G1 and G5 were related to P[8]-1, P[8]-2, and P[8]-3. In addition, the phylogenetic analysis based on estimate of genetic distances between P[8]-3 strains and the definition of a 1.5% cutoff value (with relevant statistical support) it was possible to propose a new classification for the P[8]-3 lineage into six different sub-lineages: P[8]-3.1 to P[8]-3.6. These findings reinforce the notion of the existence of constraints within specific RVA strains populations. The results obtained in this study reinforce the importance of a continuous RVA surveillance of circulating strains in order to predict the possible variants that will circulate in a country, assess the effects of vaccination on RVA circulating strains, and ultimately help in the design, challenges, and prospects of RVA vaccines.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Group A rotaviruses (RVA) are the leading cause of severe gastroenteritis among children, accounting for approximately one third of total diarrhea deaths worldwide (Tate et al., 2010). RVA genome consists of 11 double-stranded RNA (dsRNA) segments, encoding five (or six) nonstructural proteins (NSPs) and six structural proteins (VPs) (Estes and Kapikian, 2007), surrounded by a triple-layered protein capsid. Based on antigenic and genetic differences of two viral surface proteins, VP4 and VP7, RVA can be classified into P (Protease sensitive) and G (Glycosylated)

genotypes, respectively. So far, 27 G and 35 P genotypes have been identified in humans as well as in different animals (Matthijnssens and Van Ranst, 2012).

Mechanisms that promote RVA diversification include point mutations, intersegmental recombination, rearrangements, reassortment, and interspecies transmission (Desselberger, 1996; Ituriza-Gomara et al., 2000; Estes and Kapikian, 2007; Heiman et al., 2008). Point mutations and reassortments are frequently described for RVA and can eventually lead to the emergence of RVA strains that escape neutralization by specific antibodies. Five binary G/P genotype combinations (G1P[8], G3P[8], G4P[8], G9P[8], and G2P[4]) are responsible for more than 90% of human RVA cases detected around the world (Matthijnssens and Van Ranst, 2012). In Brazil, G1-G4 account for 65% of strains but the atypical G5 was also observed (Leite et al., 2008). In order to achieve efficient cell entry, the VP4 protein is cleaved by trypsin into a N-terminal fragment (VP8\*) and a C-terminal fragment (VP5\*) (Espinola et al., 2008).

\* Corresponding author. Address: Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental, Pav. Hélio & Peggy Pereira, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Avenida Brasil 4365, Manguinhos, 21040-360 Rio de Janeiro, RJ, Brazil. Tel.: +55 21 25621923; fax: +55 21 25621851.

E-mail address: marcelle@ioc.fiocruz.br (M.F.M. da Silva).

The VP8\* region has been described to contain four putative neutralization domains defined by amino acid alignments and mapping of monoclonal antibody escape mutants (Kirkwood et al., 1996). Studies demonstrated antigenic and genomic variations inside the VP8\* region, especially among strains bearing G1-G4 and G9 genotypes in association with P[8], which represent the most prevalent genotypes in humans and are the main targets for vaccine studies. So far, studies on the VP8\* fragment of P[8] genotype have shown four distinct phylogenetic lineages circulating worldwide: P[8]-1, -2, -3, and -4 (Arista et al., 2006; Cunliffe et al., 2001).

Rotarix™, a monovalent vaccine based on a human strain with G1P[8] (P[8]-1) specificity, was introduced in the National Brazilian Immunization Programs (NIP) in March, 2006. In the present report the genetic variation of P[8] genotype of human RVA strains circulating in Brazil between 1986 and 2011 is described through analysis of 135 RVA strains from vaccinated and non vaccinated children living in 4 out of the 5 Brazilian regions. In addition, a proposal to classify the P[8]-3 lineage into six different sub-lineages: P[8]-3.1 to P[8]-3.6 based on phylogenetic analysis results, is presented.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Study population

The stool samples were randomly selected from a pool of RVA positive patients, in order to uniformly represent all the study period and all geographic regions involved. Aiming to avoid selection bias, when more than one positive sample was provided by city and year, the same proportion of them were randomly selected from the pool of available samples, reaching thus the final sum of 135 patients (44 G1P[8], 21 G3P[8], 28 G5P[8] and 42 G9P[8]) obtained from children with acute diarrhea living in 4 out of the 5 Brazilian regions: Northern, Northeastern, Southeastern, and Southern between 1986 and 2011. Of the 44 G1P[8] strains, 19 were collected from children vaccinated with one or two doses of Rotarix™. This study was approved by the Institutional Research Ethics Committee (CEP-FIOCRUZ 311/06). The accession numbers of the nucleotide sequences are available in the Supplementary Material.

### 2.2. Nucleic acid purification, amplification and sequencing

Nucleic acids were extracted by the glass powder method (Boom et al., 1990) with modifications described by Leite et al.

(1996). The viral dsRNA was reverse transcribed (RT) and the primers used for amplification of VP8\* gene were designed to generate an amplicon of 887 bp from the 5' terminus of the gene (Gentsch et al., 1992). The VP8\* primers, used to obtain the RT-PCR amplicon, were employed individually for gene sequencing. Forward and reverse strand amplification reaction was carried out for each sequence obtained at least twice. DNA sequencing was performed with an ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit® and an ABI Prism 3730 Genetic Analyzer® (both from Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) by Genomic Platform of DNA sequencing PDTIS/FIOCRUZ. All procedures to avoid cross-contamination were performed, including negative controls (DNase/RNase free water – Gibco, Grand Island, USA – with RNase-Out – Invitrogen, Carlsbad, USA), during all steps.

### 2.3. Phylogenetic and genetic distance analyses

Mean nucleotide distances within and among different P[8] lineages and sub-lineages were estimated using the Tamura-Nei model (Tamura and Nei, 1993) as implemented in MEGA 4 v.4.0 software package (Tamura et al., 2007). Mean nucleotide distances between P[8]-3 sub-clusters were  $\geq 0.017$ , while mean nucleotide distances within P[8]-3 sub-clusters were  $\leq 0.012$ . Thus, based on genetic distance results, it was proposed a cutoff value of 1.5% to define distinct P[8]-3 sub-lineages.

## 3. Results and discussion

To evaluate the genetic diversity of RVA strains circulating in a country considering evolutionary forces involved are important issues in studies of anti-RVA vaccines. In order to reach a better understanding of how these forces act, numerous studies have investigated the genetic variation of the P[8] genotype worldwide (Arista et al., 2006; Espinola et al., 2008; Iturriza-Gomara et al., 2000; Stupka et al., 2012).

A total of 135 RVA P[8] strains belonging to VP7 genotypes: G1, G3, G5, and G9 were sequenced in order to evaluate the evolutionary relationships between the P[8] lineages of human RVA detected in Brazil before and after Rotarix™ introduction in the NIP in comparison with human and animal RVA strains detected worldwide. The results presented here demonstrate that P[8]-1, P[8]-2, and P[8]-3 lineages were detected in Brazil in the last 25 years. Fig. 1 shows the chronology of the three P[8] lineages detected in Brazil over the studied period. To our knowledge, these lineages are preserved overtime and in different countries (Espinola et al.,

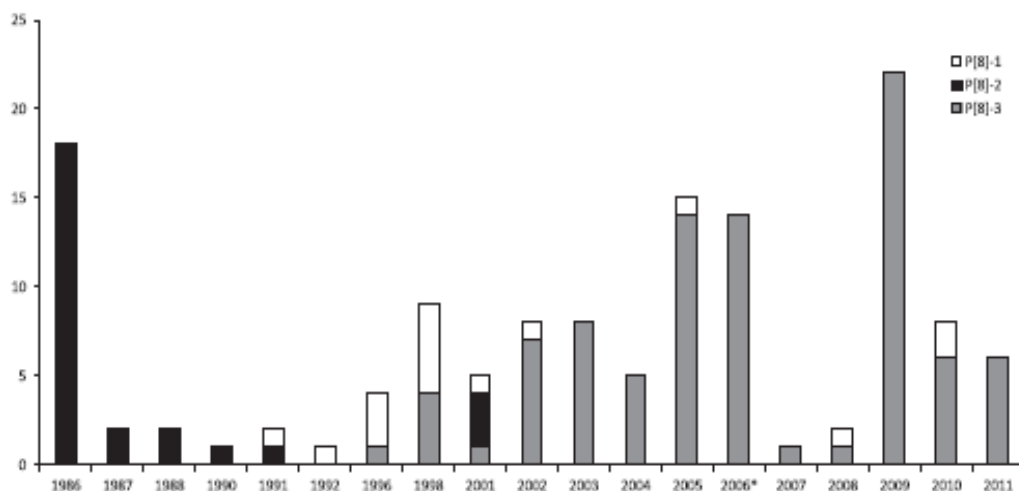


Fig. 1. P[8] lineages chronology in Brazil from 1986 to 2011. The products of the cleavage of the protein VP4 (VP5\* and VP8\*) are actually represented with the symbol\*.

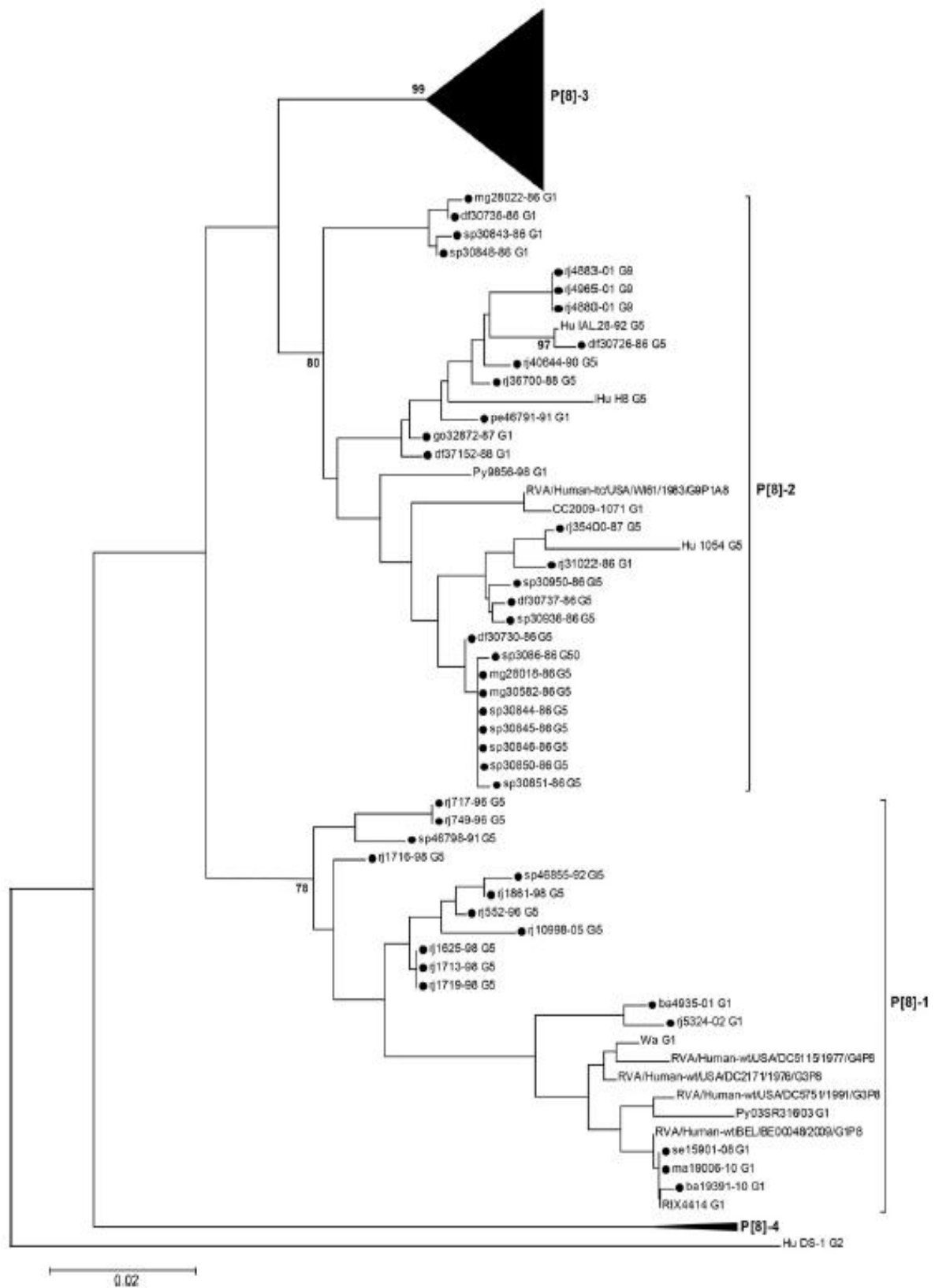


Fig. 2. Phylogenetic analysis of nucleotide sequence of VP8 encoding gene of Brazilian P[8] RVA strains described in this study showing the distribution of lineages P[8]-1, P[8]-2 and P[8]-3. Bootstrap values above 75%, estimated with 2000 pseudoreplicate data sets, are indicated at the key nodes.

2008; Iturriza-Gomara et al., 2000; Stupka et al., 2012). The P[8]-4 lineage could not be detected in the present report, which is consistent with previous studies carried out in South America (Araújo et al., 2007; Espinola et al., 2008; Tort et al., 2010). Phylogenetic analysis of the VP8\* gene demonstrate that Brazilian RVA P[8] strains clustered into three distinct evolutionary lineages: P[8]-1 ( $n = 16$ ), P[8]-2 ( $n = 27$ ), and P[8]-3 ( $n = 92$ ) (Fig. 1). The co-circulation of distinct P[8] lineages was observed throughout the study, particularly in 2001, when the lineages P[8]-1, P[8]-2 and P[8]-3 were detected co-circulating simultaneously in Brazil and this is the first report of such an event in South America. Although this phenomenon was described in other regions including the United Kingdom (P[8]-1/P[8]-2/P[8]-3) (Iturriza-Gomara et al., 2000, 2001) and Malawi (P[8]-2/P[8]-3/P[8]-4) (Cunliffe et al., 2001), the co-circulation of P[8]-1, 2 and 3 seems to be quite rare in Brazil, since in the 25-year period studied (1986–2011) was only found in 2001. The co-circulation of 2 lineages was detected in 7 years (P[8]-1 and P[8]-2 in 1992; P[8]-1 and P[8]-3 in 1996, 1998, 2002, 2005, 2008 and 2010) and the detection of only one lineage in 11 years (P[8]-1 in 1992; P[8]-2 in 1986, 1987, 1988 and 1990 and P[8]-3 in 2003, 2004, 2006, 2007, 2009 and 2011) (Fig. 1). Up to now, there are no studies reporting the co-circulation of these four P[8] lineages, suggesting that the appearance and disappearance of different P[8] lineages might be a mechanism that helps RVA to escape from the immunity developed by the population due to previous infections (Espinola et al., 2008).

The P[8]-1 lineage contains eleven G5 and five G1 Brazilian strains collected in the 1990's and in the 2000s, respectively, including three G1 strains from vaccinated children collected in 2009 and 2010 (Fig. 2). This clade also contains one G1 Paraguayan strain (EU045238), the prototype strains isolated in the 1970's (Wa-genotype G1, DC5751 and DC2171-genotype G3, DC5115-genotype G4), the genotype G1 strain BE0048 collected in 2009 in Belgium and G1 Rotarix™ vaccine strain RIX4414. The mean nucleotide distance among P[8]-1 strains was of 0.034 (Table 1). The comparative alignment analysis demonstrated the high genetic heterogeneity among the sequences (Supplementary Material 2). The alignment of the deduced amino acid sequences of VP8\* revealed amino acid substitutions in many regions: 38<sup>V</sup>-I, 41<sup>S</sup>-G, 67<sup>M</sup>-I, 123<sup>T</sup>-M, 124<sup>V</sup>-I, 128<sup>N</sup>-S, 134<sup>R</sup>-S, 138<sup>D</sup>-N, 166<sup>F</sup>-I, 170<sup>F</sup>-I, 176<sup>I</sup>-V, 192<sup>N</sup>-S, 194<sup>A</sup>-T, 198<sup>D</sup>-N and 202<sup>I</sup>-T. Further studies will be needed to determine the potential effects of the substitution changes in the P[8]-1 sequences identified in this study.

The P[8]-2 lineage consists of 16 G5 Brazilian strains detected in Brazil in the 1980/1990's, eight G1 Brazilian strain collected between 1986 and 1991 and three G9 Brazilian strains collected in 2001, besides prototype strains from different countries, genotype specificity and year of isolation include: Brazil- G5 IAL28, H8, and 1054; Malawi- G3 MW258; USA- G1 KU; and Paraguay- G1 Py9856 (Fig. 2). The mean nucleotide distance among P[8]-2 strains was of 0.03 (Table 1).

The alignment of the deduced amino acid sequences of P[8]-2 revealed few amino acid substitutions in the Brazilian strains over the time: 85SN and 191AT showing the high conservation of this lineage (Supplementary Material 2b).

Most Brazilian strains grouped within the P[8]-3 lineage which includes several strains circulating worldwide, corroborating previous studies (Espinola et al., 2008; Parra et al., 2009). This lineage was first detected in Brazil in a G5 strain collected in Rio de Janeiro in 1996 and remained detected until this date (Silva et al., 2011). P[8]-3 was the unique P[8] lineage detected circulating in Brazil after 2005, with the exception of the three P[8]-1 strains collected from vaccinated children. Within this lineage strains bearing VP7 genotypes were detected G1, G3, G5 and G9, collected from 1996 to 2011 in four different Brazilian regions: Northern (States of Acre and Rondônia), Northeastern (States of Alagoas, Bahia, Maranhão, Pernambuco, and Sergipe), Southern (State of Rio Grande do Sul) and Southeastern (States of Espírito Santo and Rio de Janeiro) (Fig. 2). It is noteworthy that G3 associated with P[8]-3 was only detected in Brazil. In the same cluster, RVA prototype strains from different countries bearing distinct VP7 genotypes were grouped as such G1, G3, G8, and G12. The mean nucleotide distance among P[8]-3 strains was of 0.021 (Table 1).

As displayed in Table 1, mean nucleotide distances between P[8]-3 sub-clusters were  $\geq 0.017$ , while mean nucleotide distances within P[8]-3 sub-clusters were  $\leq 0.012$ . Thus, the definition of a 1.5% cutoff value was established to propose a new classification for the P[8]-3 lineage into six different sub-lineages, here named P[8]-3.1 to P[8]-3.6 (Fig. 3). The sub-lineage P[8]-3.1 was the most prevalent in Brazil over the last years and comprises strains of distinct VP7 genotypes (G1, G3 and G9) collected from 2002 to 2010, and includes several prototype strains detected worldwide during the 2000s. The sub-lineage P[8]-3.1 comprises RVA prototypes described worldwide: Australia, Bangladesh, Democratic Republic of Congo, Pakistan, and Paraguay; G3 and G9 Brazilian strains circulating in Rio de Janeiro between 2002 and 2007 and G1 Brazilian strains circulating in Bahia in 2004 and Maranhão in 2010. The sub-lineage P[8]-3.2 only comprises G9 Brazilian strains circulating in Rio de Janeiro and Acre between 1998 and 2006. It was exclusively associated to G9 strains collected in Rio de Janeiro (Southeast region) from 1998 to 2003 and in Acre (North region) in 2006, consistent with previous findings (Tort et al., 2010). The sub-lineage P[8]-3.3 comprises several Brazilian strains of distinct VP7 genotypes including: 2 G1 and 4 G9 strains collected in Rio de Janeiro in 2003, one G1 strain collected in Espírito Santo in 2008 and 10 G3 strains collected in different Brazilian regions. This sub-lineage also comprises three prototypes described in Russia (Nov09-D182), Australia (CK00029), and at the United States of America (VU06-07-27). The sub-lineage P[8]-3.4 comprises Brazilian strains bearing G5, G1, and G9 genotypes, collected in Rio de Janeiro in 1996, 2001 and 2003, respectively. No prototype strains were grouped in this sub-lineage. The sub-lineage P[8]-3.5 includes G1 Brazilian strains collected in the Northeastern Brazil in 2009 and 2010 – both from vaccinated children – and prototype strains collected in Russia in 2004 and 2007 (Nov04-H578 and Omsk07-217). As shown in the P[8]-3.2 analysis, P[8]-3.5 seems to display a restricted pattern of circulation as it only comprises G1 Brazilian strains collected in the northeast of Brazil in 2009 and 2010. The sub-lineage P[8]-3.6 consist of one G9 strain collected in the Northern (State of Rondônia) in 2006 and several G1 strains obtained from vaccinated children in 2009 in the northeast of Brazil (State of Sergipe), together with prototype strains from Paraguay, Russia and Belgium. It is important to emphasize that the sub-lineages P[8]-3.5 and P[8]-3.6 were detected circulating in Brazil only after the introduction of Rotarix™. Analysis of larger datasets of Brazilian and non-Brazilian RVA P[8]-3 strains will be of paramount importance to resolve this question.

**Table 1**  
Mean nucleotide distances in VP8\* gene within (intra-sublineage) and among (inter-sublineage) P[8]-3 lineage.

	P[8]-3.1	P[8]-3.2	P[8]-3.3	P[8]-3.4	P[8]-3.5	P[8]-3.6
P[8]-3.1	<b>0.012</b>					
P[8]-3.2	0.020	<b>0.009</b>				
P[8]-3.3	0.026	0.025	<b>0.003</b>			
P[8]-3.4	0.017	0.019	0.021	<b>0.009</b>		
P[8]-3.5	0.028	0.027	0.030	0.020	<b>0.002</b>	
P[8]-3.6	0.033	0.034	0.035	0.024	0.025	<b>0.006</b>

Mean intra-sublineage (bold) and inter-sublineage nucleotide distances estimated by the Tamura Nei model with 2000 replicates using MEGA 5 program.



Fig. 3. Phylogenetic analysis of nucleotide sequence of VP8\* encoding gene of Brazilian P[8] RVA strains showing the six P[8]-3 sub-lineages. Bootstrap values above 75%, estimated with 2000 pseudoreplicate data sets, are indicated at the key nodes.

The alignment of the deduced amino acid sequences from P[8]-3 strains revealed amino acid substitutions in the sequences over the time in some positions, as shown in the Supplementary Material 2:  $78^T \rightarrow S^A$ ,  $85^N \rightarrow T$ ,  $91^V \rightarrow I$ ,  $104^A \rightarrow I$ ,  $113^N \rightarrow D^G$ ,  $147^S \rightarrow N$ ,  $149^N \rightarrow T$ ,  $169^Y \rightarrow H$ ,  $173^I \rightarrow V$ ,  $184^T \rightarrow I$  and  $194^N \rightarrow D$ , although more analyses showing the effects of these substitutions observed in the lineages/sub-lineages are needed to better understand RVA P[8]-3 evolution in Brazil.

This work contributes for a better understanding of the dynamics and pattern of P[8] dispersion into different lineages/sub-lineages and their association with G genotypes in Brazil. Both RVA licensed vaccine, Rotarix™ and Rotateq™, include genotype P[8] in their formulation. However, new P[8] variants less affected by vaccine induced immunity and can emerge as the result of one, or more evolutionary mechanisms that shape RVA evolution. Consequently, a continuous surveillance of RVA strains is needed in order to predict potential variants that may circulate and also to improve current vaccination programs.

### Acknowledgments

We would like to thank Rosane Maria Santos de Assis and Alexandre Madri Fialho for technical assistance. This study was supported/sponsored by Oswaldo Cruz Institute/Fiocruz, National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), PAPES VI FIOCRUZ – CNPq, General Coordination of Public Health Laboratories, Secretary of Health Surveillance – Ministry of Health (CGLAB/SVS), Carlos Chagas Filho Foundation for Research Support of the State of Rio de Janeiro (FAPERJ) and CAPES.

### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2013.01.004>.

### References

Araújo, I.T., Assis, R.M.S., Fialho, A.M., Mascarenhas, J.D.A.P., Heinemann, M.B., Leite, J.P.G., 2007. Brazilian P[8], G1, P[8], G5, P[8], G9, and P[4], G2 rotavirus strains: nucleotide sequence and phylogenetic analysis. *J. Med. Virol.* 79 (7), 995–1001.

Arista, S., Giammanco, G.M., De Grazia, S., Ramirez, S., Lo Biundo, C., Colomba, C., Cascio, A., Martella, V., 2006. Heterogeneity and temporal dynamics of evolution of G1 human rotaviruses in a settled population. *J. Virol.* 80 (21), 10724–10733.

Boom, R., Sol, C.J., Salimans, M.M., Jansen, C.L., Wertheim-van Dillen, P.M., van der Noordaa, J., 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* 28 (3), 495–503.

Cunliffe, N.A., Gondwe, J.S., Graham, S.M., Thindwa, B.D., Dove, W., Broadhead, R.L., Molynaux, M.E., Hart, C.A., 2001. Rotavirus strain diversity in Blantyre, Malawi, from 1997 to 1999. *J. Clin. Microbiol.* 39, 836–843.

Desselberger, U., 1996. Genome rearrangements of rotaviruses. *Arch. Virol. Suppl.* 12, 37–51.

Estes, M.K., Kapikian, A.Z., 2007. Rotaviruses. In: Knipe, D.M., Howley, P.M., Griffin, D.E., Martin, M.A., Lamb, R.A., Roizman, B., Straus, S.E. (Eds.), *Fields Virology*, fifth ed. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, pp. 1917–1974.

Gentsch, J.R., Glass, R.I., Woods, P., Gouvea, V., Gorziglia, M., Flores, J., Dax, B.K., Bhan, M.K., 1982. Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 30 (6), 1365–1373.

Heiman, E.M., McDonald, S.M., Barro, M., Taraporewala, Z.F., Bar-Magen, T., Patton, J.T., 2008. Group A human rotavirus genomics: evidence that gene constellations are influenced by viral protein interactions. *J. Virol.* 82 (22), 11106–11116.

Iturriza-Gomara, M., Green, J., Brown, D.W., Desselberger, U., Gray, J.J., 2000. Diversity within the VP4 gene of rotavirus P[8] strains: implications for reverse transcription-PCR genotyping. *J. Clin. Microbiol.* 38, 898–901.

Iturriza-Gomara, M., Isherwood, B., Desselberger, U., Gray, J., 2001. Reassortment in vivo: driving force for diversity of human rotavirus strains isolated in the United Kingdom between 1995 and 1999. *J. Virol.* 75, 3696–3705.

Kirkwood, C.D., Bishop, R.F., Coulson, R.S., 1996. Human rotavirus VP4 contains strain-specific, serotype-specific and cross-reactive neutralization sites. *Arch. Virol.* 141 (3–4), 587–600.

Leite, J.P.G., Alfieri, A.A., Woods, P.A., Glass, R.I., Gentsch, J.R., 1996. Rotavirus G and P types circulating in Brazil: characterization by RT-PCR, probe hybridization, and sequence analysis. *Arch. Virol.* 141 (12), 2365–2374.

Leite, J.P.G., Carvalho-Costa, F.A., Linhares, A.C., 2008. Group A rotavirus genotypes and the ongoing Brazilian experience: a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 103, 745–753.

Matthijssens, J., Van Ranst, M., 2012. Genotype constellation and evolution of group A rotaviruses infecting humans 2012. *Curr. Opin. Virol.* 2 (4), 426–433.

Silva, M.F.M., Tort, L.F.L., Gómez, M.M., Assis, R.M.S., Volotão, E.M., Mendonça, M.C.L., Bello, G., Leite, J.P.G., 2011. VP7 Gene of human rotavirus A genotype G5: phylogenetic analysis reveals the existence of three different lineages worldwide. *J. Med. Virol.* 83, 357–366.

Stupka, J.A., Degiuseppe, J.I., Parra, G.I., 2012. Increased frequency of rotavirus G3P[8] and G12P[8] in Argentina during 2008–2009: whole-genome characterization of emerging G12P[8] strains. *J. Clin. Virol.* 54 (2), 162–167.

Tamura, K., Nei, M., 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.* 10, 512–526.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24 (8), 1596–1599.

Tate, J.E., Patel, M.M., Steele, A.D., Gentsch, J.R., Payne, D.C., Cortese, M.M., Nakagomi, O., Cunliffe, N.A., Jiang, B., Neuzil, K.M., de Oliveira, L.H., Glass, R.I., Parashar, U.D., 2010. Global impact of rotavirus vaccines. *Exp. Rev. Vaccines* 9 (4), 395–407.

Tort, L.F.L., EdM, Volotão, de Mendonça, M.C.L., da Silva, M.F.M., Siqueira, A.A., Assis, R.M.S., Moratorio, G., Cristina, J., Leite, J.P.G., 2010. Phylogenetic analysis of human P[8]G9 rotavirus strains circulating in Brazil reveals the presence of a novel genetic variant. *J. Clin. Virol.* 47 (4), 345–355.

## **CAPITULO IV**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE CEPAS DE RVA DE  
GENÓTIPO G1P[8] NO BRASIL NO PERÍODO PRÉ E PÓS-  
VACINAÇÃO COM A RV1**

**(ARTIGO 4)**



**Artigo 4:** Vacinação com a RV1 no Brasil não tem impacto na circulação de rotavírus A de genótipo G1P[8]: análise da constelação genômica completa.

Manuscrito em fase de submissão

**Resumo:** Neste estudo foi realizada a análise filogenética dos 11 genes de cepas brasileiras de genótipo G1P[8] que circularam no país entre 1986 e 2013. Os resultados demonstraram que a constelação gênica das cepas pertence ao genótipo *Wa-like*, com especificidade G1- P[8]-I1- R1- M1- C1- A1- N1- T1- E1- H1, com exceção de duas cepas (rj14055-07 e ba19030-10) que apresentaram o gene que codifica para a NSP3 de especificidade T3, característico do genótipo *AU-1-like*, sugerindo a ocorrência de *reassortment*. Foi também demonstrado a ocorrência de reassortment entre genes de algumas cepas brasileiras e a vacina RV1. A análise filogenética do gene que codifica para VP8\* demonstrou que a linhagem de P[8] que circula atualmente no Brasil é a P[8]-3, diferentemente das linhagens de P[8] constituintes das duas vacinas atualmente licenciadas no país: RV1 (P[8]-1) e RV5 (P[8]-2).

## **RV1 vaccination in Brazil has no impact in G1P[8] rotavirus A circulation: a full genomic constellation analysis.**

Marcelle Figueira Marques da Silva\*, Tatiana Lundgren Rose, Mariela Martínez Gómez, Filipe Anibal Carvalho-Costa, Eduardo de Mello Volotão, Juliana da Silva Ribeiro de Andrade, Rosane Maria Santos de Assis, José Paulo Gagliardi Leite.

Laboratory of Comparative and Environmental Virology, Oswaldo Cruz Institute-Fiocruz, Rio de Janeiro-RJ, Brazil.

\*Address correspondence to: Marcelle Figueira Marques da Silva. Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental. Instituto Oswaldo Cruz, Av. Brasil, 4365 – Pavilhão Hélio & Peggy Pereira 21040-360. Rio de Janeiro, RJ, Brasil. marcelle@ioc.fiocruz.br

### **ABSTRACT:**

Epidemiologic data on specie A rotavirus infections have demonstrated the genetic diversity of strains circulating worldwide. Many G and P genotypes combinations have been described over the years, varying regionally and temporally, especially in developing countries, like Brazil, where a diverse range of circulating genotypes combinations have been identified. Nevertheless, the most common G and P genotypes combinations identified in RVA human strains worldwide have been G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8] and G9P[8]. Rotavirus genotype G1P[8] strains are responsible for more than 50% of children infections worldwide and component of the two vaccines (RV1 and RV5) licensed. To a better understanding of the evolutionary mechanisms of this genotype in Brazil, we analyzes ninety G1P[8] RVA strains collected between 1986 and 2013 (before and after mass vaccination with RV1) in different Brazilian states. Phylogenetic analyzes based on the eleven RVA genome segments were performed. The results showed the *Wa-like* genomic constellations of the Brazilian G1P[8] strains with the I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1 specificity, except for two strains (rj14055-07 and ba19030-10) showing a I1-R1-C1-M1-A1-N1-T3-E1-H1 genomic constellation. This study suggests that the RV1 Brazilian mass vaccination is not significantly influencing the G1P[8] fluctuation profile in the country. It was also demonstrated the reassortment between two G1P[8] strains (NSP3 gene) and the RV1 vaccine strain, showing that this event can occur in post-licensure settings and deserve attention mainly in countries using RVA mass vaccination.

## Introduction:

Diarrheal disease (DD) represents the second leading cause of death in children  $\leq 5$  years old in the developing world (Wazny et al., 2013). Specie A rotaviruses (RVA) are the main etiologic agent of DD in children in this age group worldwide (Kotloff et al., 2013), being responsible for ~196,000 cases of severe diarrhea and deaths in 2011 (Walker et al., 2013).

RVA is a member of *Reoviridae* family, the genome consists of 11 double-stranded RNA gene segments encoding six structural (VP1-4, VP6-VP7) and six non-structural proteins (NSP1-6). A dual classification system was established for RVA based on the two genes which encode the outer capsid proteins, VP4 (P-genotype) and VP7 (G-genotype) (Estes & Greenberg, 2013). More recently, a new classification system has been proposed including all 11 genes and, to date, 27 G, 37 P, 16 I, 9 R, 9 C, 8 M, 16 A, 9 N, 12 T, 14 E and 11 H genotypes have been identified so far (Matthijnsens et al., 2008; Tronjar et al., 2013).

Epidemiological studies of RVA infections have demonstrated the genetic diversity of strains circulating in different continents. In humans, at least six RVA G genotypes (G1–G4, G9, and more recently G12), and three P genotypes (P[8], P[4], and more recently P[6]) circulates worldwide generating a major impact in public health (Leite et al., 2008; Iturriza-Gómara et al., 2009; Banyai et al., 2012). The spread of different RVA genotypes and genetic variants in distinct geographical regions, as well as over the seasons, may be associated to the emergence of severe DD, both spatially restricted or globally disseminated (Carvalho-Costa et al., 2011; WHO, 2013).

In Brazil, G1P[8] have been one of the most common RVA circulating genotypes during the last two decades (Santos & Hoshino, 2005; Leite et al., 2008; Carvalho-Costa et al., 2009, 2011; Rose et al., 2013). Recent studies show a reduction in G1P[8] circulation after the introduction of the monovalent vaccine (RV1) in the National Immunization Program (NIP) in Brazil in march, 2006 (Assis et al., 2013, Ichihara et al., *in press*). Vaccination is considered effective in reducing the consequences of RVA. Two vaccines, RV1 (Glaxo SmithKline, Brentford, Middlesex, UK) and RV5 (Merck & Co., Whitehouse Station, New Jersey, USA), are licensed in several countries. Both vaccines demonstrated broad protection against each of the most common RVA genotypes (Patton, 2012).

In the current study, we describe the genetic evolution of the eleven genes from G1P[8] strains detected in Brazil from 1986 to 2013 and discuss its possible implication on the efficacy of the RV1 Brazilian vaccine program.

## **Materials and Methods**

### **Ethics**

This study is part of a project that covers diagnosis, surveillance and molecular epidemiology of viruses that cause DD approved by the Ethics Committee of Fiocruz (CEP: 311/06).

### **Fecal samples**

RVA surveillance was performed between 1986 and 2013. RVA surveillance is performed through a hierarchical network in which samples are provided by spontaneous demand in hospitals and health centers, monitored by the Brazilian Unified Health System (SUS). The fecal samples were collected by the Central Laboratory of each state and then forwarded to the Regional Rotavirus Reference Laboratory - Laboratory of Comparative and Environmental Virology (RRRL-LVCA). Forms with epidemiological, clinical, and RVA vaccination status (after March 2006) accompanied each fecal sample. Ninety G1P[8] RVA strains were selected for this study.

### **Specie A rotaviruses detection and G/P genotyping.**

RVA detection in fecal samples was carried out by enzyme immunoassay (EIA, Premier Rotaclone<sup>®</sup>, Meridian Bioscience, Inc.; Ridascreen<sup>®</sup>, R-Biopharm) and polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) (Pereira et al., 1983). Nucleic acids were extracted from 10% fecal suspensions by the glass powder method described by Boom et al. (1990), including modifications (Leite et al., 1996). The extracted RNA was reverse transcribed and RVA G and P genotyping was performed using semi-nested multiplex PCRs as previously described (WHO/IVB/08.17, 2008). Fifty seven G1P[8] strains representative from the pre-vaccination period (1986-2006) and 33 G1P[8] strains from the pos-vaccination period (2007-2013) were investigated by eleven genes sequencing analysis. Of the 33 strains detected after the year 2006, 20 belong to children vaccinated with one or two doses of RV1.

## **Eleven genes amplification and sequencing**

The amplification of the eleven genome segments from G1P[8] strains were performed using a OneStep RT-PCR Kit (QIAGEN®) following manufacturer's instructions and amplifications conditions as described previously (Tort et al., 2010; Silva et al., 2011; Gómez et al., 2013; Rose et al., 2013). Sequencing was performed with an ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit on an ABI Prism 3730 Genetic Analyzer (Applied Biosystems®, Foster City, CA, USA) at the Institute of Technology in Immunobiologicals (Bio-Manguinhos, Fiocruz) and the Genomic Platform of DNA sequencing PDTIS/FIOCRUZ. All procedures to avoid cross-contamination were performed, including negative controls (DNase/RNase free water – Gibco, Grand Island, USA – with RNaseOut – Invitrogen, Carlsbad, USA), during all steps.

## **Phylogenetic Analysis**

Nucleotide blast analyses were performed with obtained sequences and multiple sequence alignments were carried out using the ClustalW program (Thompson et al., 1994). Phylogenetic analyses were performed under the GTR+I model of nucleotide substitution, selected using the jModeltest program (Posada, 2008). Maximum Likelihood (ML) phylogenetic trees were inferred for each one of the G1P[8] eleven genes sequences with PhyML program (Guindon and Gascuel, 2003), in MEGA5.0 (Tamura et al., 2011). The statistical significance of the branch was assessed by bootstrap resampling analysis (1,000 replicates). Deduced amino acid sequences of the eleven proteins of Brazilian G1P[8] RVA strains were compared to the RV1 strain using the Bioedit v.7.2.3 software (Hall, 1999).

## Results

RVA surveillance research was conducted by the RRRL-LVCA for 27 years (1986-2013) with strains obtained from children with diarrhea (hospitalized or not) in different Brazilian regions. The G1P[8] genotype prevalence ranged from 1% to 100% among Brazilian children infected with RVA in almost three decades of analysis. The G1P[8] genotype has yearly fluctuations with peaks delimited in different seasons: 1994-1995, 1997-1998, 2000-2004 and 2008-2009 (Figure 1).

Phylogenetic trees of the 11 G1P[8] RVA genes were generated. All 90 Brazilian strains analyzed belong to the Wa-like genotype. Eighty eight strains showed a I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1 genome constellation, while one strain detected in Rio de Janeiro in 2007 (rj14055-07) showed I1-R1-C1-M1-A1-N1-T3-E1-H1 specificity and one detected in Maranhão in 2010 (ma19030-10) contained the Ix-R1-Cx-M1-A1-N1-T3-E1-H1 genome constellation (supplemental material).

### Sequence analyzes of structural genes

The VP1-3 and VP6 gene analyzes of the Brazilian strains showed that sequences grouped with several prototype strains collected in different countries, although some clusters show exclusively sequences collected in the same Brazilian state, as detected for strains in the state of Sergipe in 2009 (Figure 2 a,b,c and f). Identity values between G1P[8] Brazilian strains and RV1 vaccine ranged from 92,9% to 100%, 90,2% to 100%, 92% to 100% and 88,1% to 100% for nucleotide (nt) and 96,2% to 100%, 90,1% to 100%, 95,6% to 100% and 94,6% to 100% for amino acid (aa) sequences in VP1, VP2, VP3 and VP6, respectively. Three strains showed 100% aa identity with RV1 in at least one of the VP1, VP2, VP3 or VP6 genes (Table 1).

Phylogenetic analysis based on the VP8\* (aa 1-247) portion of VP4 encoding gene showed that Brazilian strains (Figure 2 d) clustered into three evolutionary lineages. P[8]-1 lineage clustering the RV1 and RV1-like strains (se15901-08, ma19006-10, and ba19391-10); P[8]-2 lineage with strains detected in the 1980's and beginning of 1990's; P[8]-3 lineage with most Brazilian G1P[8] strains, into different P[8]-3 sublineages. The alignment of the deduced amino acid sequences showed that the potential trypsin cleavage sites at arginine 240 and 246 were both conserved in all 90 G1P[8] Brazilian samples and RV1. The proline 68, 71, 224, and 225 residues; the cysteine residue at position 215 which were highly conserved among the VP8\* RVA gene portion, were also maintained in all Brazilian strains and RV1. No change was observed on epitopes 8-2 and 8-4 (Figure 3).

Four G1 VP7 lineages (G1-I, G1-II, G1-III and G1-V) were detected in the Brazilian strains independent of the years. Into the G1-I and G1-II grouped G1P[8] strains previously detected in the 1990's and still circulate in Brazil, and strains collected in different Brazilian regions in the 1980's and beginning of 1990's grouped into the G1-III and G1-V lineages (Figure 2e). Identity values between G1P[8] Brazilian strains and RV1 vaccine ranged from 92,5% to 100% for nt and 93,8% to 100% for aa sequences (Table 1). When comparing the sequence regions defined as antigenic epitopes (7-1 and 7-2) for the VP7 protein, it was observed at least two epitopes (aa 94, 123, 148, 217) that were not conserved in the Brazilian strains when compared with the RV1 VP7 gene (Figure 4).

The strain se15901-08, detected in Sergipe state in 2008, showed 100% nt identity to the RV1 strain for all structural genes. This strain was collected from a child who had been vaccinated with the first dose of RV1 seven days before the beginning of symptoms, suggesting a case of shedding.

### **Sequence analyses of nonstructural genes**

Similar to the core encoding VP1-3 and VP6 genes, NSP1-5 genes analyzes of the Brazilian strains showed that sequences group with prototypes collected in worldwide, although some clusters show exclusively sequences collected in the same Brazilian state, as detected for strains in the state of Sergipe in 2009 (Figure 2 g, h, i, j and k). Identity values between G1P[8] Brazilian strains and RV1 vaccine ranged from 89% to 100%, 88,4% to 100%, 90,1% to 100% and 92,5% to 100% for nt and 90,7% to 100%, 93,6% to 100%, 94,8% to 100% and 92,8% to 100% for aa sequences in NSP1, NSP2, NSP4 and NSP5, respectively. Three strains showed 100% aa identity with RV1 in at least one of the NSP1, NSP2, NSP4 or NSP5 genes (Table 1).

The NSP3 analysis showed that two strains collected in different years and Brazilian regions (rj14055-07 and ba19030-10) belongs to T3 genotype. Both strains showed maximum nt identity with the prototype G3P[9] RVA strain detected in Japan in 1982, AU-1 (Data not shown).

As observed for the structural genes, strain se15901-08 showed 100% nt identity to the RV1 strain for nonstructural genes.

## Discussion

In Brazil, a wide GP[ ] combination have been reported in cases of children infected with RVA since the decade of 1980's. Recent studies describe Brazilian most common combinations (G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8] and G9P[8]) and uncommon (G1P[6], G3P[6], G5P[8], G8P[8], G8P[4], G12P[8], G12P[9]) genotypes circulating in the country in the last decades (Leite et al., 2008; Tort et al., 2010; Carvalho-Costa et al., 2011; Silva et al., 2011; da Silva et al., 2013; Gomez et al., 2010, 2013, 2014; Luchs et al., 2014). G1P[8] strains are responsible for more than 50% of children infections worldwide and have been found to contribute significantly in RVA diarrhea in different age groups (Kang et al., 2009; Benati et al., 2010; Tate et al., 2010). As reported by Rose et al. (2013), G1P[8] remains being detected in Brazil, even after the RV1 mass vaccination introduction in 2006, evidencing the importance of G1P[8] full genome analysis in strains collected in different Brazilian regions for its evolutionary profile and evaluation of the vaccination program.

During the 27-years G1P[8] Brazilian surveillance, the prevalence of this genotype seems to vary annually, with changes in the relative frequencies over the years. Our findings show that Brazilian G1P[8] fluctuation has some peaks in the seasons of 1994-1995, 1997-1998, 2000-2004 and 2008-2009. In a previous study, Giammanco et al., (2014), showed the most RVA GP[ ] combinations detected in Palermo, Italy, between 1985 and 2011, and observed that G1P[8] presented a similar fluctuation profile over time as found in the present study. It is interesting to mention that despite the similar genotype prevalence in population, Brazilian children have been vaccinated with a G1P[8] specificity vaccine (RV1) since march 2006, whereas Italian children are not vaccinated against RVA, suggesting that the mass RV1 vaccination in Brazil may not have impacted the G1P[8] genotype circulation in the country.

In the current study, one strain (se15901-08) was collected from a two months old child who was immunized seven days before hospitalization. The 11 RVA genome segments analyzes showed the 100% nt identity to the RV1 strain, evidencing a case of vaccine shedding. Anderson et al. (2008) described 35-80% of healthy RV1 vaccinated children shedding the RVA vaccine strain seven days after taken the first dose and 11-29% after the second dose. Therefore, the vaccine virus deposited by individuals into the environment may offer direct protection to the unvaccinated children, consequently herd effect could increase and be beneficial in populations with low vaccine coverage (Rivera *et al.*, 2011). Furthermore, studies in Australia, Austria, Brazil, and El Salvador reported a reduction in RVA disease and GA cases in either unvaccinated and vaccinated cohorts suggesting



that the reduction of RVA transmission by the vaccinated population could benefit the unvaccinated members of the community (Patel et al., 2012).

The study reports for the first time the 11 genome segments analyzes from G1P[8] clinical strains collected in a time period of 27-years in different Brazilian regions in order to investigate how this genotype have evolved in Brazil during three decades of investigation. Our results showed no evidence for selection pressure by RV1 vaccination in Brazil, as strains collected before and after 2006 (year of mass vaccination introduction in Brazil) are quite similar for all genes. Unfortunately, it is difficult to determine the relationship between the sequences within each Brazilian region due to the reduced number of strains for each state. Nonetheless, it is clear that multiple clusters of human Wa-like genotype G1P[8] RVAs co-circulated and caused the disease between 1986 and 2013. Two strains (rj14055-07 and ba19030-10) collected after the RV1 vaccination, which belongs to T3 NSP3 genotype, were related to the AU-1-like genotype constellation. Many studies have reported this genogrouping system to show the existence of intergenogroup reassortments between different RVA animal or human genogroups. However, the existence and effectiveness of heterogeneous genome constellations remains unclear probably because is caused by mechanisms that create protein sets that work better when kept together (Heiman et al., 2008).

The results obtained in the current study showed that four Brazilian strains (es15221-08, ma19006-10, ba19391-10 and rj22288-13) were closely related to the RV1 strain, for, at least, one genome segment suggesting the possibility of reassortment between RV1 and circulating strains. During a 5-year surveillance study carried out in Hungary, Laszlo et al. (2012) identified 55 G1P[8] strains closely related, but not identical to the RV1 parental strain (strain 89-12) although their vaccine origin were unknown.

In a study conducted in Bangladeshi with G1P[8] circulating in 2003, Rahman et al. (2010) reported that genetic changes have been described to occur in different genes of the circulating strains over time resulting in the increase in genetic distance from the prototype strains. The results obtained in VP1-VP3, VP6 and NSP1-NSP5 analyzes showed that Brazilian G1P[8] strains have closer identity to prototype strains of different GP[ ] combination specificities belonging to genotype constellation 1 collected in the same time period, despite the prototype country of origin. The present study corroborate previous findings in China (Shintani et al., 2012), India (Arora et al., 2011) and South Korea (Le et al., 2010).

Analysis of the VP8\* encoding gene revealed that G1 circulated in association with different P[8] lineages in Brazil during the 27-years study. P[8]-1 lineage clustering the RV1 and RV1-like

strains, P[8]-2 lineage with strains detected in the 1980's and beginning of 1990's and P[8]-3 lineage with most Brazilian G1P[8] strains. The P[8]-3 seems to be the unique lineage currently circulating in Brazil whereas the lineage component of the RV1 vaccine is P[8]-1. Silva et al. (2013) reported previously a great P[8]-3 Brazilian variety and proposed a classification into 6 P[8]-3 sublineages. In the present study we detected 5 different P[8]-3 sublineages circulating in association with G1. P[8]-3.2, a sublineage found circulating associated with genotype G9, was not found. It is important to mention 2 sublineages exclusively associated with strains collected in 2009 in two states of Northeast of Brazil (P[8]-3.5 grouping strains collected in Pernambuco and P[8]-3.6 with strains collected in Sergipe). In a study conducted in Finland, Hemming & Vesikari (2013) also reported the great circulation of P[8]-3 in association with G1 in an over 20-year period. Similar results were reported by Imbert-Marcille et al. (2013) showing a wide circulation of P[8]-3 sublineages in 62 patients with diarrhea in France in the years of 2010, 2011 and 2012. The P[8] VP8\* protein fragment of the Brazilian strains contained differences in three (8-1, 8-2, 8-3) of the four antigenic epitopes of this fragment, corroborating previous studies which also found substitutions in VP8\* antigenic epitopes of G1P[8] strains (Rahman et al., 2010; Rose et al., 2013; Hemming & Vesikari, 2013).

In the present study, analysis of the VP7 gene showed the circulation of four G1 lineages in Brazil during the last three decades. Strains collected in the 1980's and 1990's grouped into the G1-III and G1-V lineages, despite strains collected in the late 1990's, 2000's and the currently circulating grouped into G1-I and G1-II lineages. These results corroborate previous studies conducted in Argentina (Barril et al., 2013), Brazil (Maranhão et al., 2012), South Korea (Le et al., 2010) and Vietnam (Trang et al., 2012). Comparison between the VP7 genome segment of the study strains and RV1 show differences in the Brazilian G1P[8] strains. RV1 vaccine belongs to G1-II specificity. Two strains collected in the state of Rio de Janeiro after RV1 mass vaccination in Brazil (rj14055-07 and rj22888-13) grouped into the G1-II, however their sequences are quite different from the vaccine strain. Various aa substitutions were detected comparing the Brazilian strains and RV1, including changes inside antigenic sites (7-1 and 7-2), however further studies will be needed to determine the potential effects of these substitutions identified in the study.

Our findings provide additional information to understand how the G1P[8] genotype have evolved in Brazil. This study suggests that the RV1 Brazilian mass vaccination is not significantly influencing the G1P[8] fluctuation profile in the country. It was also demonstrated the reassortment between 2 G1P[8] strains (NSP3 gene) and the RV1 vaccine strain, showing that this event can occur in post-licensure settings and deserve attention mainly in countries using RVA mass vaccination. Therefore, the improvement of RVA surveillance programs that include full genome sequencing

analysis will contribute to better understand some points as how the introduction of a vaccine may affect the circulating human or animal RVAs strains, the real frequency of RVA intergenogroup reassortment events under natural conditions and the RVA strains stability generated by such events.

### **Acknowledgments**

We would like to thank Alexandre Madri Fialho for technical assistance. The authors thank the staff at Institute of Immunobiological Technology (Bio-Manguinhos/Fiocruz) - Marco Alberto Medeiros and Rafael Lawson Ferreira, for their technical support in sequencing reactions. This study was sponsored by Oswaldo Cruz Institute/Fiocruz (Proep/CNPq and PAPES VI), General Coordination of Public Health Laboratories, Secretary of Health Surveillance, Ministry of Health (CGLAB/SVS), FAPERJ, Mercosul Research Program- PCPP/CAPES.

## References

Arora R, Chitambar SD. Full genomic analysis of Indian G1P[8] rotavirus strains. *Infect Genet Evol.* 2011 Mar;11(2):504-11.

Assis AS, Valle DA, Antunes GR, Tibiriça SH, Assis RM, Leite JP et al. Rotavirus epidemiology before and after vaccine introduction. *J Pediatr (Rio J).* 2013 Sep-Oct;89(5):470-6.

Bányai K, László B, Duque J, Steele AD, Nelson EA, Gentsch JR et al. Systematic review of regional and temporal trends in global rotavirus strain diversity in the pre rotavirus vaccine era: insights for understanding the impact of rotavirus vaccination programs. *Vaccine.* 2012 Apr 27;30 Suppl 1:A122-30.

Barril P, Martínez L, Giordano M, Masachessi G, Isa M, Pavan J, Glikmann G, Nates S. Genetic and antigenic evolution profiles of G1 rotaviruses in Córdoba, Argentina, during a 27-year period (1980-2006). *J Med Virol.* 2013 Feb;85(2):363-9.

Benati FJ, Maranhão AG, Lima RS, da Silva RC, Santos N. Multiple-gene characterization of rotavirus strains: evidence of genetic linkage among the VP7-, VP4-, VP6-, and NSP4-encoding genes. *J Med Virol.* 2010 Oct;82(10):1797-802.

Boom, R., Sol, C. J., Salimans, M. M., Jansen, C. L., Wertheim-van Dillen, P. M. & van der Noordaa, J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 1990. 28, 495-503.

Carvalho-Costa FA, Araújo IT, Santos de Assis RM, Fialho AM, de Assis Martins CM, Bóia MN et al. Rotavirus genotype distribution after vaccine introduction, Rio de Janeiro, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2009;15(1):95-7.

Carvalho-Costa FA, Volotão Ede M, de Assis RM, Fialho AM, de Andrade Jda S, Rocha LN et al. Laboratory-based rotavirus surveillance during the introduction of a vaccination program, Brazil, 2005-2009. *Pediatr Infect Dis Journal.* 2011;30(1):S35-41.

da Silva Soares L, de Fátima Dos Santos Guerra S, do Socorro Lima de Oliveira A, da Silva Dos Santos F, de Fátima Costa de Menezes EM, Mascarenhas JD, Linhares AC. Diversity of rotavirus strains circulating in Northern Brazil after introduction of a rotavirus vaccine: High prevalence of G3P[6] genotype. *J Med Virol.* Oct 17. doi: 10.1002/jmv.23797. [Epub ahead of print].

Estes MK, Greenberg HB. Rotaviruses. Fields Virology. 6th edição. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia; 2013.

Giammanco GM, Bonura F, Zeller M, Heylen E, Van Ranst M, Martella V, Bányai K, Matthijssens J, De Grazia S. Evolution of DS-1-like human G2P[4] rotaviruses assessed by complete genome analyses. *J Gen Virol.* 2014 Jan;95(Pt 1):91-109.

Gómez MM, de Mendonça MC, Volotão Ede M, Tort LF, da Silva MF, Cristina J et al. Rotavirus A genotype P[4]G2: genetic diversity and reassortment events among strains circulating in Brazil between 2005 and 2009. *J Med Virol.* 2011;83(6):1093-106.

Gómez MM, da Silva MF, Zeller M, Heylen E, Matthijssens J, Ichihara MY et al. Phylogenetic analysis of G1P[6] group A rotavirus strains detected in Northeast Brazilian children fully vaccinated with Rotarix™. *Infect Genet Evol.* 2013 Oct;19:395-402.

Guindon S, Gascuel O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol* 2003. 52: 696–704.

Hall, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* (1999) 41:95-98.

Heiman EM, McDonald SM, Barro M, Taraporewala ZF, Bar-Magen T, Patton JT. Group A human rotavirus genomics: evidence that gene constellations are influenced by viral protein interactions. *J Virol.* 2008; 82(22):11106-16.

Hemming M, Vesikari T. Detection of Rotateq® Vaccine-Derived Double Reassortant Rotavirus in a 7-Year-Old Child with Acute Gastroenteritis. *Pediatr Infect Dis J.* 2013 Dec 9 (19) 51-58.

Ichihara M.Y.T, Rodrigues L.C., Santos C.A., Teixeira M.G., De Jesus S.R., Matosa S.M.A., Leite J.P.G., Barreto M.L. Effectiveness of rotavirus vaccine against hospitalized rotavirus diarrhea: A case-control study. *Vaccine* (2014) Article in press.

Imbert-Marcille BM, Barbé L, Dupé M, Le Moullac-Vaidye B, Besse B, Peltier C et al. A FUT2 Gene Common Polymorphism Determines Resistance to Rotavirus A of the P[8] Genotype. *J Infect Dis.* 2013 Dec 29. [Epub ahead of print].

Iturriza-Gómara M, Dallman T, Bányai K, Böttiger B, Buesa J, Diedrich S, Fiore L, Johansen K, Korsun N, Kroneman A, Lappalainen M, László B, Maunula L, Matthinjssens J, Midgley S, Mladenova Z, Poljsak-Prijatelj M, Pothier P, Ruggeri FM, Sanchez-Fauquier A, Schreier E, Steyer A, Sidaraviciute I, Tran AN, Usonis V, Van Ranst M, de Rougemont A, Gray J. Rotavirus surveillance in Europe, 2005-2008: web-enabled reporting and real-time analysis of genotyping and epidemiological data. *J Infect Dis.* 2009 Nov 1;200 Suppl 1:S215-21.

Kang G, Arora R, Chitambar SD, Deshpande J, Gupte MD, Kulkarni M, Naik TN, Mukherji D, Venkatasubramanian S, Gentsch JR, Glass RI, Parashar UD; Indian Rotavirus Strain Surveillance Network. Multicenter, hospital-based surveillance of rotavirus disease and strains among Indian children aged <5 years. *J Infect Dis.* 2009 Nov 1;200 Suppl 1:S147-53.

Kotloff KL, Nataro JP, Blackwelder WC, Nasrin D, Farag TH, Panchalingam S, Wu Y, Sow SO, Sur D, Breiman RF, Faruque AS, Zaidi AK, Saha D, Alonso PL, Tamboura B, Sanogo D, Onwuchekwa U, Manna B, Ramamurthy T, Kanungo S, Ochieng JB, Omere R, Oundo JO, Hossain A, Das SK, Ahmed S, Qureshi S, Quadri F, Adegbola RA, Antonio M, Hossain MJ, Akinsola A, Mandomando I, Nhampossa T, Acácio S, Biswas K, O'Reilly CE, Mintz ED, Berkeley LY, Muhsen K, Sommerfelt H, Robins-Browne RM, Levine MM. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. *Lancet.* 2013 Jul 20;382(9888):209-22.

László B1, Kónya J, Dandár E, Deák J, Farkas Á, Gray J, Grósz G, Iturriza-Gómara M, Jakab F, Juhász Á, Kisfali P, Kovács J, Lengyel G, Martella V, Melegh B, Mészáros J, Molnár P, Nyúl Z, Papp H, Pátri L, Puskás E, Sántha I, Schneider F, Szomor K, Tóth A, Tóth E, Szűcs G, Bányai K. Surveillance of human rotaviruses in 2007-2011, Hungary: exploring the genetic relatedness between vaccine and field strains. *J Clin Virol.* 2012 Oct;55(2):140-6.

Le VP, Chung YC, Kim K, Chung SI, Lim I, Kim W. Genetic variation of prevalent G1P[8] human rotaviruses in South Korea. *J Med Virol.* 2010 May;82(5):886-96.

Leite, J. P., Alfieri, A. A., Woods, P. A., Glass, R. I. & Gentsch, J. R. Rotavirus G and P types circulating in Brazil: characterization by RT-PCR, probe hybridization, and sequence analysis. *Arch Virol* 1996. 141, 2365-2374

Leite JP, Carvalho-Costa FA, Linhares AC. Group A rotavirus genotypes and the ongoing Brazilian experience: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2008;103,745-53.

Luchs A, Timenetsky Mdo C. Unexpected detection of bovine G10 rotavirus in a Brazilian child with diarrhea. *J Clin Virol.* 2014 Jan;59(1):74-6.

Maranhão AG, Vianez-Júnior JL, Benati FJ, Bisch PM, Santos N. Polymorphism of rotavirus genotype G1 in Brazil: in silico analysis of variant strains circulating in Rio de Janeiro from 1996 to 2004. *Infect Genet Evol.* 2012 Oct;12(7):1397-404.

Matthijnssens J, Ciarlet M, Heiman E, Arijs I, Delbeke T, McDonald SM et al. Full genome-based classification of rotaviruses reveals a common origin between human Wa-Like and porcine rotavirus strains and human DS-1-like and bovine rotavirus strains. *J Virol.* 2008 Apr;82(7):3204-19

Patel MM, Glass R, Desai R, Tate JE, Parashar UD. Fulfilling the promise of rotavirus vaccines: how far have we come since licensure? *Lancet Infect Dis.* 2012 Jul;12(7):561-70.

Patton JT. Rotavirus diversity and evolution in the post-vaccine world. *Discov Med.* 2012 Jan;13(68):85-97. Review.

Posada D. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Mol Biol Evol* 2008. 25: 1253–1256.

Rahman M, Matthijnssens J, Saiada F, Hassan Z, Heylen E, Azim T, Van Ranst M. Complete genomic analysis of a Bangladeshi G1P[8] rotavirus strain detected in 2003 reveals a close evolutionary relationship with contemporary human Wa-like strains. *Infect Genet Evol.* 2010 Aug;10(6):746-54.

Rivera L, Peña LM, Stainier I, Gillard P, Chevart B, Smolenov I, Ortega-Barria E, Han HH. Horizontal transmission of a human rotavirus vaccine strain--a randomized, placebo-controlled study in twins. *Vaccine.* 2011 Nov 28;29(51):9508-13.

Rose TL, Silva MFM, Gómez MM, Resque HR, Ichihara MY, Volotão E de M, Leite JP. Evidence of Vaccine-related Reassortment of Rotavirus, Brazil, 2008–2010. *Emerg Infect Dis.* 2013 Nov;19(11):1843-6.

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

Shintani T, Ghosh S, Wang YH, Zhou X, Zhou DJ, Kobayashi N. Whole genomic analysis of human G1P[8] rotavirus strains from different age groups in China. *Viruses.* 2012 Aug;4(8):1289-304.

Silva MFM, Tort LF, Gómez MM, Assis RM, de Mendonça MC, Volotão EM, Leite JP. Phylogenetic analysis of VP1, VP2, and VP3 gene segments of genotype G5 group A rotavirus strains circulating in Brazil between 1986 and 2005. *Virus Res.* 2011 Sep;160(1-2):381-8.

Silva MFM, Gómez MM, Rose TL, Volotão Ede M, Carvalho-Costa FA, Bello G, Leite JP. VP8\*P[8] lineages of group A rotaviruses circulating over 20 years in Brazil: proposal of six different sub-lineages for P[8]-3 clade. *Infect Genet Evol.* 2013 Jun;16:200-5.

Tate JE, Patel MM, Steele AD, Gentsch JR, Payne DC, Cortese MM et al. Global impact of rotavirus vaccines. *Expert Rev Vaccines.* 2010 Apr;9(4):395-407.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol.* 2011 Oct;28(10):2731-9.

Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. CLUSTAL W improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 1994 Nov 11;22(22):4673-80.

Tort LF, Volotão Ede M, de Mendonça MC, da Silva MF, Siqueira AA, Assis RM et al. Phylogenetic analysis of human P[8]G9 rotavirus strains circulating in Brazil reveals the presence of a novel genetic variant. *J Clin Virol.* 2010;47(4):345-55.

Trang NV, Yamashiro T, Anh le TK, Hau VT, Luan le T, Anh DD. Genetic variation in the VP7 gene of rotavirus G1P[8] strains isolated in Vietnam, 1998-2009. *Virus Res.* 2012 May;165(2):190-6.

Trojnar E, Sachsenröder J, Twardziok S, Reetz J, Otto PH, Johne R. Identification of an avian group A rotavirus containing a novel VP4 gene of close relationship to those of mammalian rotaviruses. *J Gen Virol.* 2013 Jan;94(Pt 1):136-42

Walker C.L., Rudan I., Liu L., Nair H., Theodoratou E., Bhutta Z., O'Brien K.L, Campbell H. Global burden of childhood pneumonia and diarrhea. *Lancet* 2013; 381: 1405–16.

Robert E BlackWazny K, Zipursky A, Black R, Curtis V, Duggan C, Guerrant R et al. Setting research priorities to reduce mortality and morbidity of childhood diarrhoeal disease in the next 15 years. *PLoS Med.* 2013;10(5):e1001446

WHO. Rotavirus vaccines WHO position paper: January 2013 - Recommendations. *Vaccine.* 2013 Jun



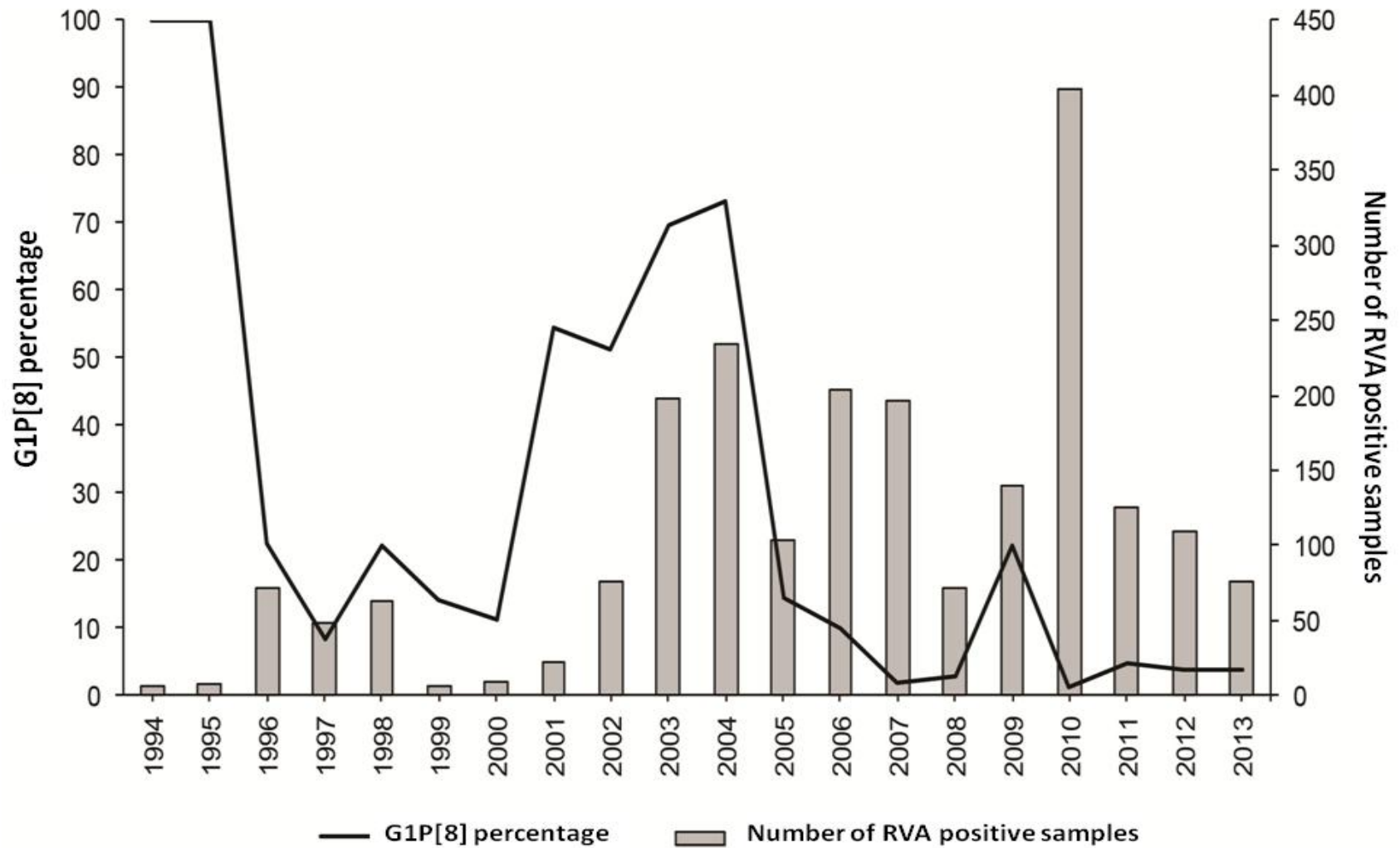
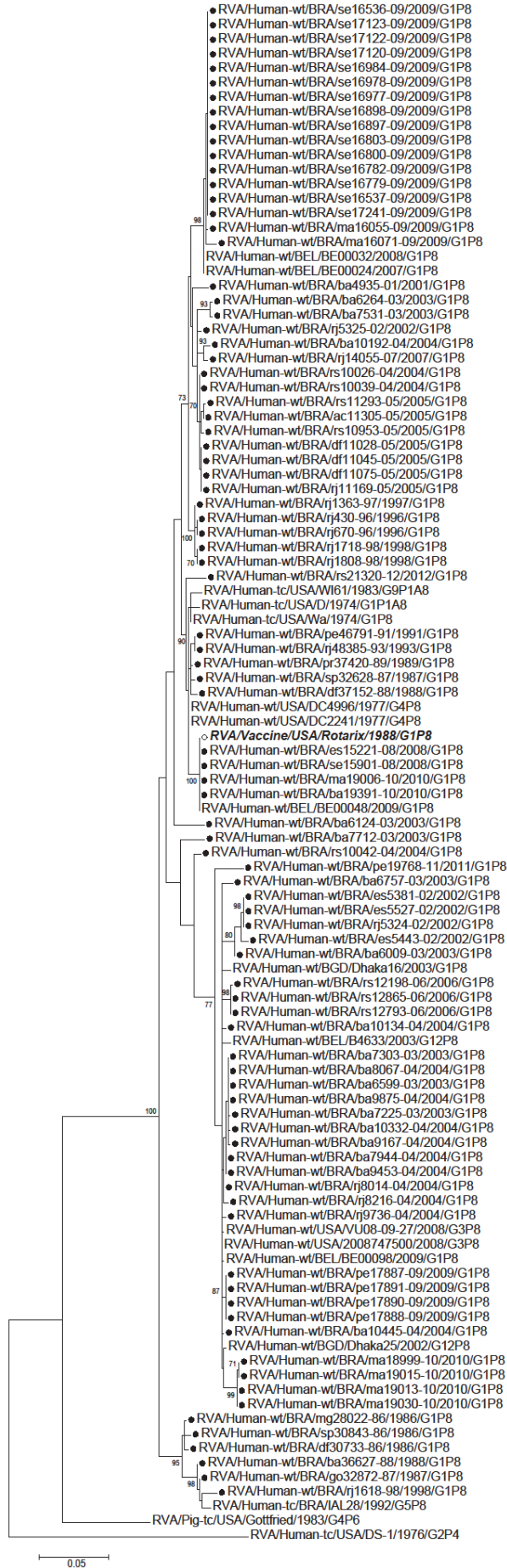
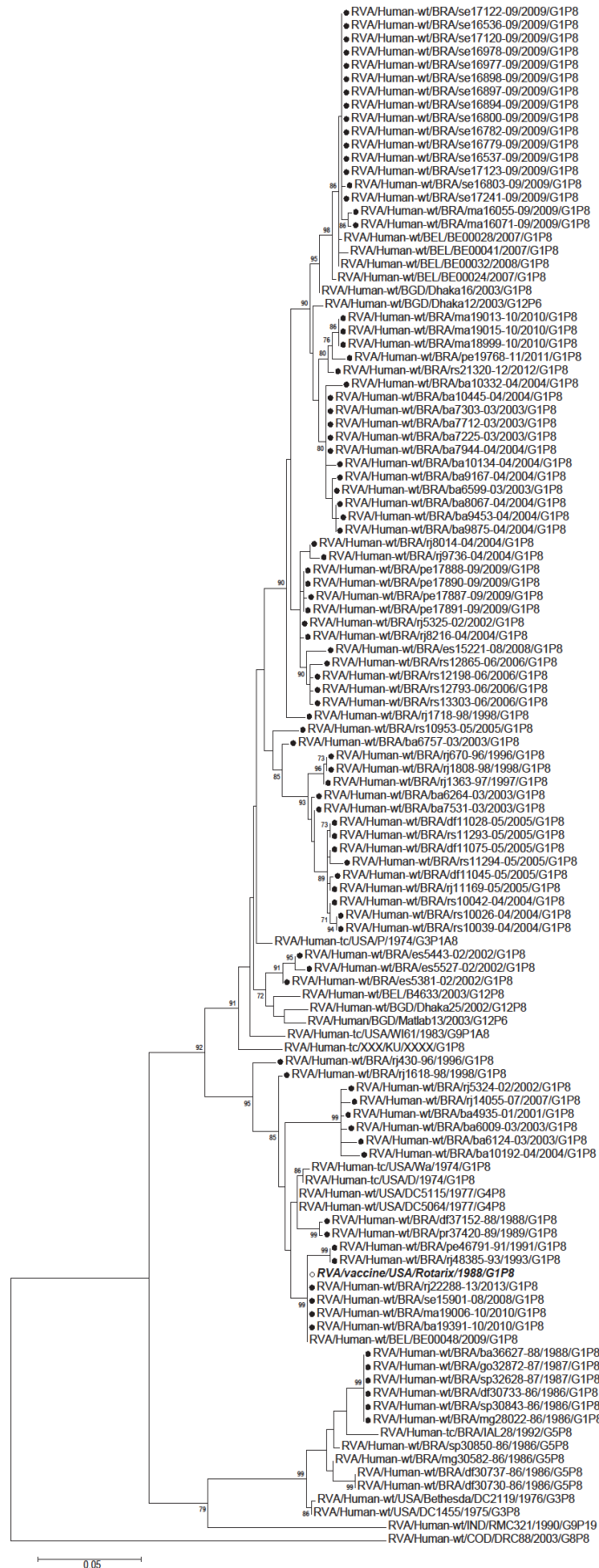


Figure 1. Number of RVA positive strains analyzed in the Regional Rotavirus Reference Laboratory - Laboratory of Comparative and Environmental Virology (RRRL-LVCA) and the G1P[8] chronology in Brazil from 1994 to 2013.

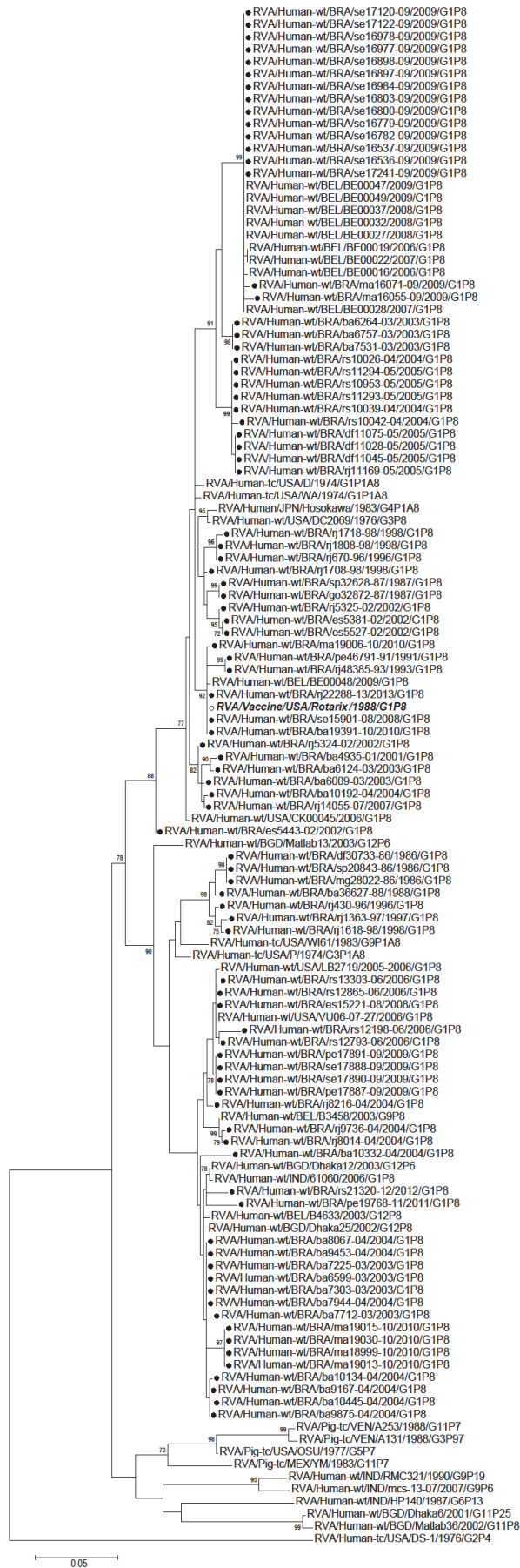
a) VP1



b) VP2



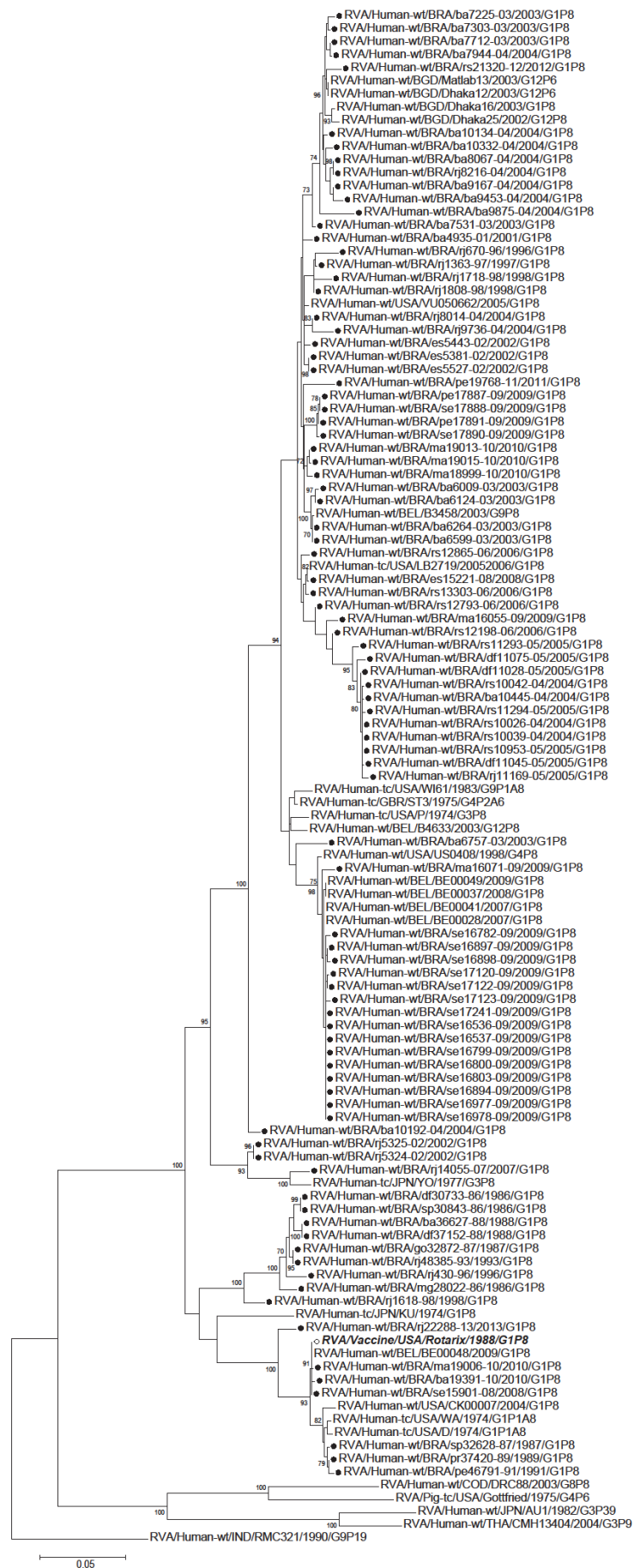
c) VP3



d) VP4



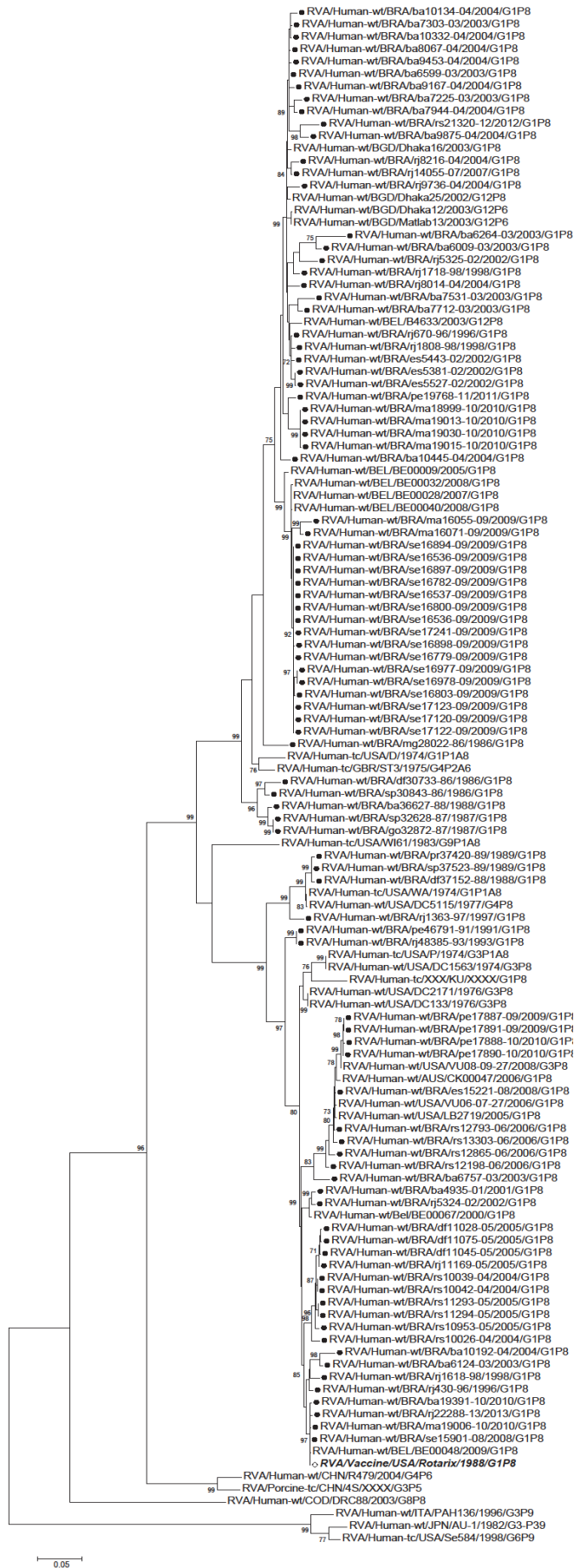
e) VP6



f) VP7

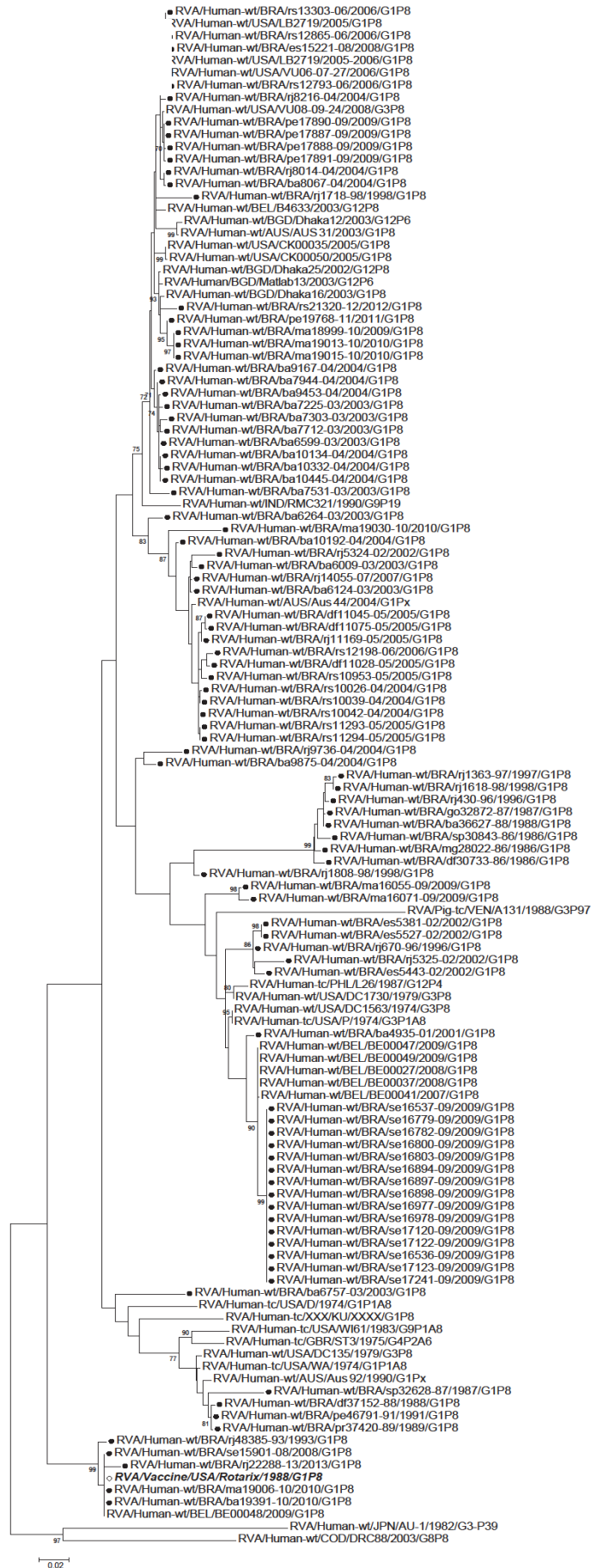


g) NSP1





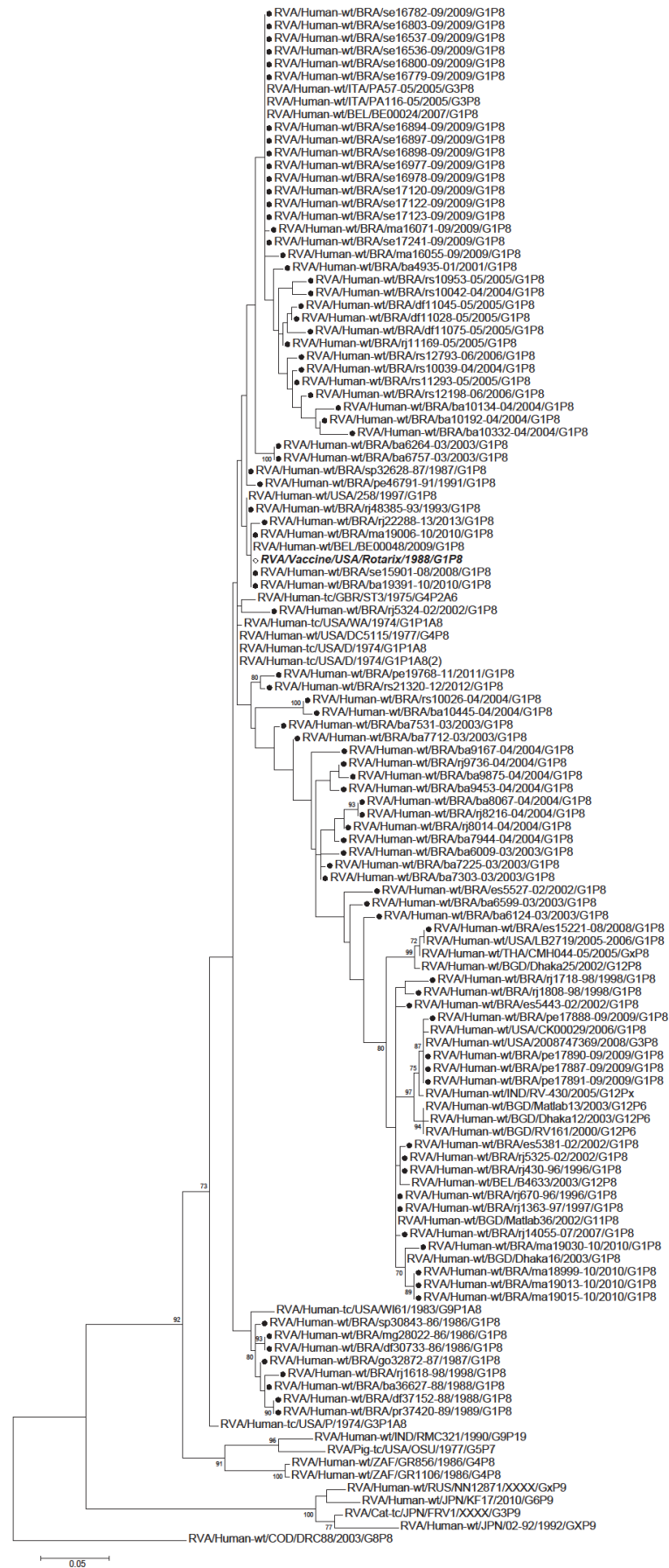
h) NSP2



i) NSP3



j) NSP4



k) NSP5

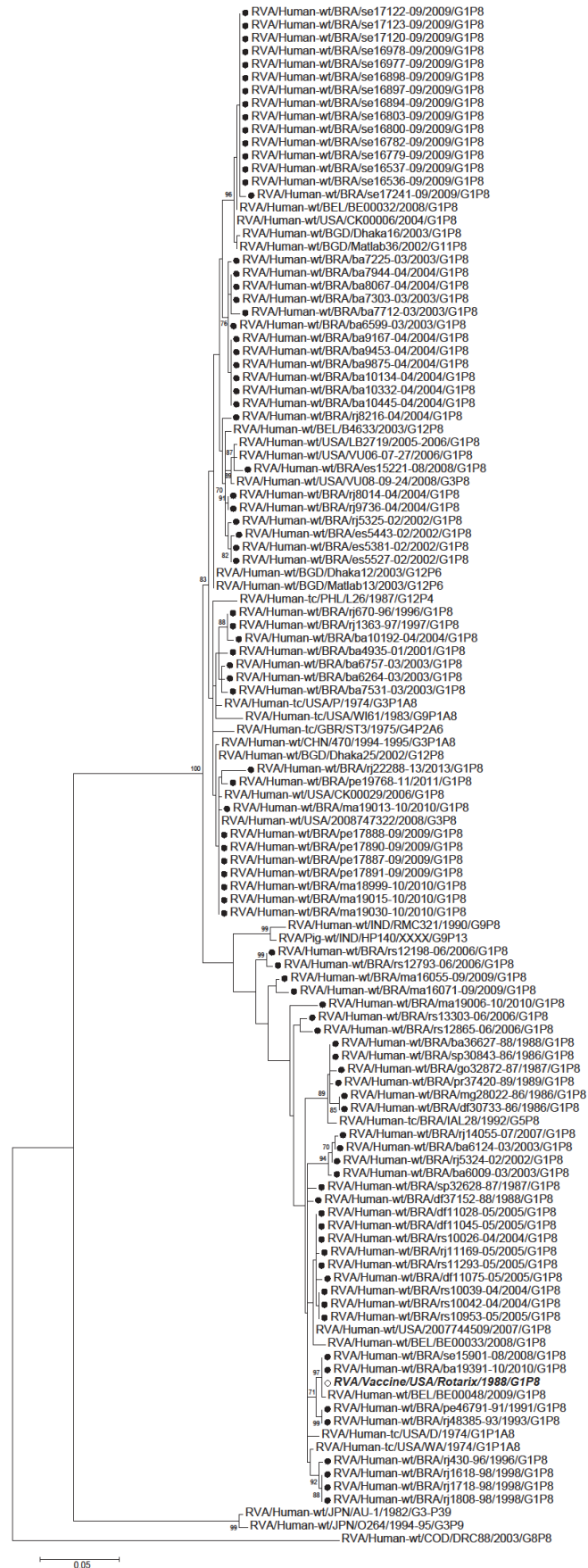


Figure 2. Phylogenetic analysis of nucleotide sequence of (a) VP1, (b) VP2, (c) VP3, (d) VP8\*, (e) VP6, (f) VP7, (g) NSP1, (h) NSP2, (i) NSP3, (j) NSP4 and (k) NSP5 of Brazilian G1P[8] rotavirus A strains. The strains of the present study are indicated with ●. The RV1 vaccine strain is indicated with ◇.









Strains	RVA/Vaccine/USA/Rotarix/1988/G1P8																					
	VP1		VP2		VP3		VP4		VP6		VP7		NSP1		NSP2		NSP3		NSP4		NSP5	
	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa
RVA/Human-wt/BRA/rs10039-04/2004/G1P8	97,3	98,1	91,6	91,4	97,1	98,9	97,8	98,9	90,1	96,9	97,7	97,8	97,6	96,9	90,2	94,9	98,3	99,0	97,1	97,1	98,8	98,4
RVA/Human-wt/BRA/rs10042-04/2004/G1P8	95,3	98,1	91,9	90,7	96,7	98,3	90,9	98,3	90,2	96,9	97,7	97,8	97,6	96,9	90,1	94,9	98,2	98,7	96,2	96,5	98,8	98,4
RVA/Human-wt/BRA/ba10134-04/2004/G1P8	94,2	97,6	91,4	91,0	93,2	97,8	91,5	97,8	90,3	97,1	93,5	94,2	89,3	82,5	90,0	96,2	95,9	97,7	95,4	97,7	93,4	94,4
RVA/Human-wt/BRA/ba10192-04/2004/G1P8	96,9	97,6	95,1	95,0	97,8	98,9	91,0	98,9	90,3	98,0	97,2	96,7	96,0	95,4	90,2	95,2	96,5	98,3	95,8	96,0	93,0	92,8
RVA/Human-wt/BRA/ba10332-04/2004/G1P8	93,9	97,2	90,1	90,1	94,0	97,8	91,3	97,8	90,6	97,7	93,8	94,5	89,9	82,5	89,9	96,2	95,9	97,7	95,6	95,4	93,4	94,4
RVA/Human-wt/BRA/ba10445-04/2004/G1P8	93,9	97,2	91,9	92,8	92,9	96,7	91,3	96,7	90,2	96,9	94,0	95,2	89,4	82,7	90,0	96,2	95,9	97,7	95,2	96,5	93,4	94,4
RVA/Human-wt/BRA/rs10953-05/2005/G1P8	97,0	98,1	92,4	95,2	97,1	98,9	97,5	98,9	90,1	96,9	97,5	97,4	97,5	96,2	90,5	94,9	98,0	98,7	95,2	94,8	98,8	98,4
RVA/Human-wt/BRA/df11028-05/2005/G1P8	97,2	97,6	91,9	93,7	96,9	98,9	96,9	98,9	90,2	97,1	97,7	97,8	97,6	97,3	90,4	94,9	98,2	99,3	96,4	96,0	98,6	98,4
RVA/Human-wt/BRA/df11045-05/2005/G1P8	97,2	97,6	91,7	95,8	96,9	98,9	96,2	98,9	90,0	96,6	97,4	97,8	97,5	97,3	89,9	94,9	98,1	99,0	96,4	97,1	98,6	98,4
RVA/Human-wt/BRA/df11075-05/2005/G1P8	97,2	97,6	91,9	92,7	96,9	98,9	97,2	98,9	90,0	96,3	97,5	97,4	97,5	97,1	89,8	94,6	98,1	99,0	96,0	96,0	98,3	97,4
RVA/Human-wt/BRA/rj11169-05/2005/G1P8	97,2	97,6	91,9	92,3	96,9	98,9	95,9	98,9	88,7	95,7	97,4	97,4	97,6	97,3	90,1	94,9	98,0	98,7	96,7	97,1	98,4	98,4
RVA/Human-wt/BRA/rs11293-05/2005/G1P8	96,9	97,6	91,9	92,7	97,1	98,9	94,4	98,9	90,3	97,4	97,7	97,8	97,6	97,1	90,1	94,9	98,2	99,0	96,9	97,7	98,6	98,4
RVA/Human-wt/BRA/rs11294-05/2005/G1P8	93,6	97,2	91,6	89,8	97,1	98,9	98,1	98,9	90,1	96,9	97,7	97,8	97,6	97,1	90,1	94,9	98,1	99,0	96,9	97,7	98,6	98,4
RVA/Human-wt/BRA/rs12198-06/2006/G1P8	93,8	97,6	92,4	92,8	93,8	96,7	93,8	96,7	88,7	97,1	96,7	96,7	96,4	96,9	90,4	94,3	96,9	98,7	95,6	97,7	96,2	96,4
RVA/Human-wt/BRA/rs12793-06/2006/G1P8	93,8	97,6	92,4	92,8	93,2	97,2	93,6	97,2	90,4	97,4	95,8	96,3	95,7	95,4	90,7	96,2	97,3	98,3	95,6	94,8	95,9	96,4
RVA/Human-wt/BRA/rs12905-06/2006/G1P8	93,5	97,2	91,7	13,9	93,1	97,2	93,5	97,2	90,4	96,9	94,2	95,2	95,8	95,8	90,6	95,8	96,1	95,4	95,6	94,8	97,9	97,4
RVA/Human-wt/BRA/rs13303-06/2006/G1P8	96,7	97,6	92,4	91,5	92,9	96,7	93,3	96,7	90,8	97,4	93,9	94,5	95,5	95,4	90,6	95,8	95,9	95,4	95,6	94,8	98,3	98,4
RVA/Human-wt/BRA/rj14055-07/2007/G1P8	96,7	97,2	95,7	96,8	98,0	98,9	91,5	98,9	91,5	98,5	97,9	98,1	89,3	82,9	90,1	95,2	75,7	83,2	92,8	94,8	97,4	98,4
RVA/Human-wt/BRA/es15221-08/2008/G1P8	100,0	100,0	91,7	93,4	93,1	97,2	90,9	97,2	90,8	97,4	94,3	95,2	95,4	95,2	90,7	95,8	96,8	98,0	92,8	94,8	92,0	92,8
RVA/Human-wt/BRA/se15901-08/2008/G1P8	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
RVA/Human-wt/BRA/ma16055-09/2009/G1P8	95,8	96,2	90,2	92,3	96,0	96,1	91,3	96,1	90,4	96,6	95,0	96,3	88,2	78,6	89,4	96,5	96,8	96,4	96,9	96,0	96,8	96,9
RVA/Human-wt/BRA/ma16071-09/2009/G1P8	96,7	97,2	90,2	91,9	96,1	96,1	91,5	96,1	90,3	96,9	94,9	95,6	89,0	79,8	89,0	96,8	97,1	96,7	96,9	96,0	96,9	96,4
RVA/Human-wt/BRA/se16536-09/2009/G1P8	96,7	97,2	90,7	92,8	96,5	96,7	91,4	96,7	90,1	97,4	94,2	94,2	89,6	82,0	88,4	95,2	97,7	98,0	97,5	96,5	92,7	92,8
RVA/Human-wt/BRA/se16537-09/2009/G1P8	96,7	97,2	90,7	92,8	96,5	96,7	91,5	96,7	90,1	97,4	94,4	94,9	89,6	82,0	88,4	95,2	97,8	98,0	97,7	97,1	92,7	92,8
RVA/Human-wt/BRA/se16779-09/2009/G1P8	96,7	97,2	90,7	92,8	96,5	96,7	91,5	96,7	90,2	97,4	94,3	94,5	89,6	82,0	88,4	95,2	97,8	98,0	97,5	96,5	92,7	92,8
RVA/Human-wt/BRA/se16788-09/2009/G1P8	96,7	97,2	90,7	92,8	96,5	96,7	91,5	96,7	90,1	97,4	94,4	94,9	89,6	82,0	88,4	95,2	97,7	98,0	97,7	97,1	92,7	92,8
RVA/Human-wt/BRA/se16800-09/2009/G1P8	96,7	97,2	90,7	92,8	96,5	96,7	91,5	96,7	90,1	97,4	94,4	94,9	89,6	82,3	88,4	95,2	97,8	98,0	97,5	96,5	92,7	92,8
RVA/Human-wt/BRA/se16803-09/2009/G1P8	96,7	97,2	90,5	92,8	96,5	96,7	91,6	96,7	90,1	97,4	94,4	94,9	89,6	81,6	88,4	95,2	97,8	98,0	97,7	97,1	92,7	92,8
RVA/Human-wt/BRA/se16907-09/2009/G1P8	96,7	97,2	90,7	92,8	96,5	96,7	91,4	96,7	90,1	97,4	93,8	93,8	89,6	82,0	88,4	95,2	97,8	98,0	97,7	97,1	92,7	92,8
RVA/Human-wt/BRA/se16908-09/2009/G1P8	96,7	97,2	90,7	92,8	96,5	96,7	91,4	96,7	90,0	97,1	93,9	94,2	89,6	82,0	88,4	95,2	97,8	98,0	97,7	97,1	92,7	92,8
RVA/Human-wt/BRA/se16977-09/2009/G1P8	96,7	97,2	90,7	92,8	96,5	96,7	91,5	96,7	90,0	96,9	94,3	94,5	89,5	81,8	88,4	95,2	97,8	98,0	97,7	97,1	92,7	92,8
RVA/Human-wt/BRA/se16978-09/2009/G1P8	96,7	97,2	90,7	92,8	96,5	96,7	91,5	96,7	90,1	97,4	94,3	94,5	89,5	81,4	88,4	95,2	97,8	98,0	97,7	97,1	92,7	92,8
RVA/Human-wt/BRA/se16989-09/2009/G1P8	96,7	97,2	90,7	92,8	96,5	96,7	91,4	96,7	88,9	97,1	94,4	94,9	89,5	81,8	88,4	95,2	97,8	98,0	97,7	97,1	92,7	92,8
RVA/Human-wt/BRA/se17120-09/2009/G1P8	96,7	97,2	90,7	92,8	96,5	96,7	91,4	96,7	90,0	97,4	94,4	94,9	89,5	81,8	88,4	95,2	97,8	98,0	97,7	97,1	92,7	92,8
RVA/Human-wt/BRA/se17122-09/2009/G1P8	96,7	97,2	90,7	92,8	96,5	96,7	91,5	96,7	90,0	97,4	94,4	94,9	89,5	81,8	88,4	95,2	97,8	98,0	97,7	97,1	92,7	92,8
RVA/Human-wt/BRA/se17123-09/2009/G1P8	96,7	97,2	90,7	92,8	96,5	96,7	91,4	96,7	88,8	97,1	94,4	94,9	89,5	81,8	88,4	95,2	97,8	98,0	97,7	97,1	92,7	92,8
RVA/Human-wt/BRA/se17241-09/2009/G1P8	93,8	97,2	90,7	92,8	96,5	96,7	91,5	96,7	90,1	97,4	94,2	94,2	89,5	81,8	88,4	95,2	97,8	98,0	97,7	97,1	92,4	92,3
RVA/Human-wt/BRA/pe17887-09/2009/G1P8	93,8	97,2	92,7	93,2	93,4	97,8	91,6	97,8	90,8	97,7	94,0	94,9	95,4	95,0	90,3	96,2	96,7	98,3	91,4	94,2	93,6	94,4
RVA/Human-wt/BRA/pe17888-09/2009/G1P8	93,8	97,2	92,5	93,2	93,4	97,8	91,5	97,8	90,8	97,7	94,0	94,9	95,3	95,0	90,2	96,2	96,7	98,3	90,1	90,8	93,6	94,4
RVA/Human-wt/BRA/pe17900-09/2009/G1P8	93,8	97,2	92,5	93,2	93,4	97,8	91,4	97,8	90,8	97,4	94,0	94,9	95,5	95,2	90,3	96,2	96,7	98,3	91,4	94,2	93,6	94,4

Strains	RVA/Vaccine/USA/Rotarix/1988/G1P8																					
	VP1		VP2		VP3		VP4		VP6		VP7		NSP1		NSP2		NSP3		NSP4		NSP5	
	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa
RVA/Human-wt/BRA/pe17901-09/2009/G1P8	92,9	96,2	92,5	93,2	93,4	97,8	91,5	97,8	90,8	97,7	94,0	94,9	95,4	95,0	90,2	96,2	96,7	98,3	91,4	94,2	93,6	94,4
RVA/Human-wt/BRA/ma18099-10/2010/G1P8	100,0	100,0	91,0	91,5	93,6	96,7	91,0	96,7	90,7	97,7	93,4	94,2	89,5	82,7	89,3	95,5	96,0	97,7	91,6	94,8	93,6	94,4
RVA/Human-wt/BRA/ma19006-10/2010/G1P8	93,0	96,7	100,0	100,0	99,6	99,4	99,8	99,4	99,9	99,7	100,0	100,0	99,9	100,0	100,0	100,0	100,0	99,8	99,4	97,9	97,4	
RVA/Human-wt/BRA/ma19013-10/2010/G1P8	92,9	96,2	91,0	91,5	93,6	96,7	91,2	96,7	90,4	97,7	93,3	93,8	89,5	82,7	89,3	95,5	96,0	97,7	91,6	94,8	93,4	93,9
RVA/Human-wt/BRA/ma19015-10/2010/G1P8	93,0	96,7	91,0	91,5	93,6	96,7	91,2	96,7	90,5	97,7	93,4	94,2	89,4	82,7	89,3	95,5	96,0	97,7	91,6	94,8	93,6	94,4
RVA/Human-wt/BRA/ma19030-10/2010/G1P8	100,0	100,0			93,6	96,7	91,3	96,7			93,4	94,2	89,5	82,7	89,5	94,9	75,6	83,2	91,4	93,7	93,6	94,4
RVA/Human-wt/BRA/ba19391-10/2010/G1P8	94,7	96,2	100,0	100,0	100,0	100,0	99,8	100,0	99,8	99,7	100,0	100,0	99,7	99,7	100,0	100,0	100,0	100,0	99,6	98,8	100,0	100,0
RVA/Human-wt/BRA/pe19768-11/2011/G1P8	97,6	96,7	91,1	92,0	92,7	95,6	91,4	95,6	90,5	95,7	95,6	95,6	89,8	80,6	89,7	95,8	95,6	96,4	96,4	97,7	93,4	93,9
RVA/Human-wt/BRA/rs21320-12/2012/G1P8	99,6	99,5	91,4	92,3	92,0	95,6	91,4	95,6	90,8	97,7	94,2	94,5	89,4	83,5	89,8	95,8	96,1	98,0	97,3	98,2	93,4	93,9
RVA/Human-wt/BRA/rj22288-13/2013/G1P8	97,6	99,5	100,0	100,0	100,0	100,0	91,4	95,6	97,1	98,8	98,9	98,5	99,7	99,3	98,9	98,7	97,2	97,4	98,4	98,2	95,1	95,4

Table 1. Nucleotide and aminoacid similarities values between RV1 strain gene segments and the Brazilian G1P[8] strains. The strain names are shown on the left and the protein encoded by each gene is presented at the top. In yellow are indicated the 100% identity between strain and RV1. In red are shown sequences that could not be amplified.

Strains	Genomic Constellation										
	VP7	VP4	VP6	VP1	VP2	VP3	NSP1	NSP2	NSP3	NSP4	NSP5
RVA/Human-wt/BRA/mg28022-86/1986/G1P8	G1	P8	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/BRA/df30733-86/1986/G1P8	G1	P8	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/BRA/sp30843-86/1986/G1P8	G1	P8	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/BRA/sp32628-86/1986/G1P8	G1	P8	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/BRA/go32872-87/1987/G1P8	G1	P8	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/BRA/ba36627-88/1988/G1P8	G1	P8	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/BRA/df37152-88/1988/G1P8	G1	P8	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/BRA/pr37420-89/1989/G1P8	G1	P8	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/BRA/pe46791-91/1991/G1P8	G1	P8	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/BRA/rj48385-93/1993/G1P8	G1	P8	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/BRA/rj430-96/1996/G1P8	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/BRA/rj670-96/1996/G1P8	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/BRA/rj1363-97/1997/G1P8	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/BRA/rj1618-98/1998/G1P8	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/BRA/rj1718-98/1998/G1P8	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/BRA/rj1808-98/1998/G1P8	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/BRA/ba4935-01/2001/G1P8	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/BRA/rj5324-02/2002/G1P8	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/BRA/rj5325-02/2002/G1P8	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/BRA/es5381-02/2002/G1P8	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/BRA/es5443-02/2002/G1P8	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/BRA/es5527-02/2002/G1P8	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/BRA/ba6009-03/2003/G1P8	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/BRA/ba6124-03/2003/G1P8	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/BRA/ba6264-03/2003/G1P8	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/BRA/ba6599-03/2003/G1P8	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/BRA/ba6757-03/2003/G1P8	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/BRA/ba7225-03/2003/G1P8	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/BRA/ba7303-03/2003/G1P8	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/BRA/ba7531-03/2003/G1P8	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/BRA/ba7712-03/2003/G1P8	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/BRA/ba7944-04/2004/G1P8	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/BRA/rj8014-04/2004/G1P8	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/BRA/ba8067-04/2004/G1P8	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/BRA/rj8216-04/2004/G1P8	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/BRA/ba9167-04/2004/G1P8	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/BRA/ba9453-04/2004/G1P8	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/BRA/rj9736-04/2004/G1P8	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/BRA/ba9875-04/2004/G1P8	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/BRA/rs10026-04/2004/G1P8	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/BRA/rs10039-04/2004/G1P8	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/BRA/rs10042-04/2004/G1P8	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/BRA/ba10134-04/2004/G1P8	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/BRA/ba10192-04/2004/G1P8	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1

RVA/Human-wt/BRA/ba10332-04/2004/G1P8	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/BRA/ba10445-04/2004/G1P8	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/BRA/rs10953-05/2005/G1P8	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/BRA/df11028-05/2005/G1P8	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/BRA/df11045-05/2005/G1P8	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/BRA/df11075-05/2005/G1P8	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/BRA/rj11169-05/2005/G1P8	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/BRA/rs11293-05/2005/G1P8	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/BRA/rs11294-05/2005/G1P8	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/BRA/rs12198-06/2006/G1P8	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/BRA/rs12793-06/2006/G1P8	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/BRA/rs12865-06/2006/G1P8	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/BRA/rs13303-06/2006/G1P8	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/BRA/rj14055-07/2007/G1P8	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T3	E1	H1
RVA/Human-wt/BRA/es15221-08/2008/G1P8	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/BRA/se15901-08/2008/G1P8	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/BRA/ma16055-09/2009/G1P8	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/BRA/ma16071-09/2009/G1P8	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/BRA/se16536-09/2009/G1P8	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/BRA/se16537-09/2009/G1P8	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/BRA/se16779-09/2009/G1P8	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/BRA/se16782-09/2009/G1P8	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/BRA/se16800-09/2009/G1P8	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/BRA/se16803-09/2009/G1P8	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/BRA/se16894-09/2009/G1P8	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/BRA/se16897-09/2009/G1P8	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/BRA/se16898-09/2009/G1P8	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/BRA/se16977-09/2009/G1P8	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/BRA/se16978-09/2009/G1P8	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/BRA/se17120-09/2009/G1P8	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/BRA/se17122-09/2009/G1P8	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/BRA/se17123-09/2009/G1P8	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/BRA/se17241-09/2009/G1P8	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/BRA/pe17887-09/2009/G1P8	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/BRA/pe17888-09/2009/G1P8	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/BRA/pe17890-09/2009/G1P8	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/BRA/pe17891-09/2009/G1P8	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/BRA/ma18999-10/2010/G1P8	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/BRA/ma19006-10/2010/G1P8	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/BRA/ma19013-10/2010/G1P8	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/BRA/ma19015-10/2010/G1P8	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/BRA/ma19030-10/2010/G1P8	G1	P[8]	-	R1	-	M1	A1	N1	T3	E1	H1
RVA/Human-wt/BRA/ba19391-10/2010/G1P8	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/BRA/pe19768-11/2011/G1P8	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/BRA/rs21320-12/2012/G1P8	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Human-wt/BRA/rj22288-13/2013/G1P8	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1

Supplementary material: Genome constellations of RVA Brazilian G1P[8] strains. *Wa-like* genotypes are shown in green and *AU-1-like* genotypes in orange. – represents the absence of data.

# **CAPITULO V**

**DISCUSSÃO, CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS**

## 1. Discussão

### 1.1. Diversidade genética dos rotavírus da espécie A

As GA constituem a segunda maior causa de morte de crianças  $\leq 5$  anos e os RVA são os principais agentes causadores da doença em todo o mundo. Apesar da ampla utilização das terapias orais de reidratação (TOR) e do aumento do conhecimento disponível, aproximadamente 196.000 crianças morrem anualmente em decorrência da GA causada por RVA, a maioria nos países em desenvolvimento (Walker *et al.*, 2013).

As alterações do padrão de migração eletroforética dos 11 segmentos genômicos de RVA são um dos aspectos observados nos estudos de diversidade destes vírus e estão relacionadas aos diferentes mecanismos descritos como geradores de variabilidade dos RVA: mutações pontuais, rearranjos genéticos, reestruturação de segmentos genômicos (reassortment) e recombinação genética (Estes & Greenberg, 2013).

Dados da literatura vêm descrevendo a ocorrência de infecções interespecies mundialmente e envolvendo uma ampla gama de hospedeiros, principalmente entre animais domésticos e humanos (Gabbay *et al.*, 2008; Esona *et al.*, 2010; Martella *et al.*, 2011). O estreito relacionamento interespecies associado aos diferentes mecanismos de variabilidade genética de RVA favorece o surgimento de novas variantes genotípicas e até mesmo de novos genótipos de RVA, fenômenos geralmente observados nos países em desenvolvimento (Afrad *et al.*, 2013; Mukherjee *et al.*, 2013).

Até o presente momento, pelo menos 27 genótipos G e 37 genótipos P foram descritos em cepas de RVA coletadas em aves e várias espécies de mamíferos. Porém, em humanos, somente os genótipos G1-G6, G8-G12 e G20 foram detectados em associação com os genótipos P[1]-P[11], P[14], P[19], P[25] e P[28] (Matthijnsens *et al.*, 2011, Cowley *et al.*, 2013). A maioria dos estudos epidemiológicos tem demonstrado que cepas de genótipos G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8] e G9P[8] são responsáveis pela maioria das infecções em humanos em todo o mundo. No Brasil estes genótipos representam 75% das cepas de RVA descritas (Leite *et al.*, 2008, Linhares & Justino, 2014; Carvalho-Costa *et al.*, manuscrito em preparação).

Sabe-se que a prevalência de genótipos de RVA varia geograficamente, de modo que os países em desenvolvimento apresentam uma maior variabilidade de combinações

GP[ ] circulantes, possivelmente devido à precariedade do saneamento básico e ao estreito convívio com animais, como suínos e bovinos. Fatores como o fluxo contínuo migratório de pessoas no mundo; a emergência de novas variantes de cepas; a baixa dose infectante (aproximadamente 10 partículas); fatores relacionados ao hospedeiro (genéticos, anticorpos maternos, imunodeficiência, parasitas intestinais, má nutrição, deficiência de zinco, entre outros) também podem influenciar na diversidade de genótipos de RVA (Matthijnssens *et al.*, 2012). Neste contexto, a introdução de vacinas poderia representar mais um fator a ser considerado.

Atualmente, pelo menos 41 países introduziram a vacina RV1 no seu calendário de imunizações (WHO/UNICEF, 2013). Apesar dos estudos de Fase III com a RV1 terem sido satisfatórios (Vesikari *et al.*, 2007; Linhares *et al.*, 2008; Mhadi *et al.*, 2010) e a OMS ter recomendado aos países a inclusão de uma vacina RVA em seus programas de imunização, diversas questões tem sido postuladas, tais como: i) a introdução de uma vacina monovalente G1P[8] poderia resultar no aumento da prevalência de genótipos que não tenham a especificidade G1 ou P[8] em sua contelação gênica, como o G2P[4], na população? ii) a reestruturação gênica intra-, inter-genogrupos e entre cepas selvagens e vacinal de RVA poderiam ocorrer com maior frequência e prejudicar a eficácia das vacinas?

Com os estudos envolvendo a análise filogenética dos onze genes de cepas de RVA, pode-se verificar que cepas antes consideradas de genótipos diferentes passaram a compor o mesmo genótipo, como no caso dos genótipos G5-G11, de modo que a diversidade dos RVA não é tão grande quanto se imaginava. As cepas passaram a ser classificadas em três principais genótipos: *Wa-like* (genótipo 1), comum a humanos e suínos; *DS-1-like* (genótipo 2), comum a humanos e bovinos e *AU-1-like* (genótipo 3), comum a felinos. Duas constelações genéticas prevalecem mundialmente: *Wa-like* e *DS-1-like*. Dos genótipos mais prevalentes mundialmente só um contem uma constelação *DS-1-like* (G2P[4]). Os demais genótipos são *Wa-like* (G1P[8], G3P[8], G4P[8] e G9P[8]) (Matthijnssens e Van Ranst, 2012).



## 1.2. Análise da diversidade genética do genótipo G5P[8] circulando de 1986 a 2005 no Brasil (Artigos 1, 2 e apêndice)

O genótipo G5P[8] é comumente detectado em suínos mundialmente. Foi primeiramente descrito infectando humanos no Brasil e posteriormente na Argentina e Paraguai, se mantendo restrito à América do Sul (Gouvea *et al.*, 1994, Alfieri *et al.*, 1996; Cardoso *et al.*, 2000; Bok *et al.*, 2001; Coluchi *et al.*, 2002). Era um genótipo endêmico no Brasil, detectado em aproximadamente 10% das amostras RVA positivas durante as décadas de 1980 até meados da década de 1990, quando passou a ser apenas esporadicamente detectado. O genótipo G9 foi primeiramente descrito nos USA em 1983 e posteriormente não foi detectado por uma década em nenhuma região do mundo até meados da década de 1990, quando ocorreu uma emergência global deste genótipo. No Brasil, ele teve a sua prevalência aumentada ao passo que G5 diminuía, sugerindo a substituição do genótipo G5 pelo G9 no país (Santos *et al.*, 2003; Gentsch *et al.*, 2005; Leite *et al.*, 2008; Iturriza-Gomara *et al.*, 2011). A última descrição de G5 no Brasil foi em 2005, descrita por Carvalho-Costa *et al.* (2007).

Após a substituição do genótipo G5 pelo genótipo G9 no país não foi detectada a sua circulação em humanos no continente Americano, ao passo que países Africanos e Asiáticos vêm descrevendo casos de internação infantil por GA devido aos RVA de genótipo G5 (Ahmed *et al.*, 2007; Duan *et al.*, 2007; Hashizume *et al.*, 2008; Esona *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2011; Mladenova *et al.*, 2012; Komoto *et al.*, 2013).

Os resultados apresentados no presente estudo demonstram que a constelação genética das cepas de RVA de genótipo G5P[8] que circularam no Brasil entre 1986 e 2005 é G5-P[8]-I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1, ou seja, possuem a constelação genética *Wa-like* (genótipo 1), compartilham um ancestral comum com suínos. Matthijnsens & Van Ranst (2012) descreveram que a constelação I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1 em associação com P[8] e diferentes genótipos G foi a mais detectada mundialmente durante as três últimas décadas. Com o advento do novo sistema de classificação para RVA é possível entender a história evolutiva das cepas, uma vez que muita informação era perdida analisando somente os genes que codificam as proteínas do capsídeo externo. Resultados demonstraram que a diversidade genética das cepas de RVA humano é mais limitada do que se pensava, sugerindo que somente cepas de duas

constelações genótípicas foram bem sucedidas na manutenção da infecção de humanos ao longo das décadas: a *Wa-like* e a *DS-I-like*.

Nos artigos apresentados no presente trabalho, foi realizada a análise filogenética dos genes que codificam para as proteínas VP7, VP4 (Artigo 1), VP1, VP2 e VP3 (Artigo 2) e VP6, NSP1, NSP2, NSP3, NSP4 e NSP5 (apêndice).

A análise filogenética do gene que codifica para a proteína VP7, os resultados da análise filogenética e das distâncias genéticas entre as três linhagens descritas (linhagem I, linhagem II e linhagem III) sugerem que as cepas brasileiras humanas de genótipo G5 são resultado de dois eventos de transmissão zoonótica independentes: a) uma, resultando na linhagem humana detectada no Brasil (linhagem I); b) o outro resultando na linhagem que circula na Ásia e África. As cepas suínas são encontradas nas posições mais basais dentro de cada cluster, sugerindo que os suínos são o principal reservatório natural e fonte de cepas de RVA G5 tanto para humanos quanto para outras espécies de animais, como suínos, bovinos e equinos.

Embora um estudo prévio com análise de cepas brasileiras humanas de genótipo G5 (Alfieri *et al.*, 1996) relatar uma estreita relação genética com cepas suínas de genótipo G5 através das técnicas de hibridização RNA-RNA e sequenciamento dos genes VP7 e VP8\*, há poucos estudos envolvendo o sequenciamento dos 11 genes de cepas humanas G5. Até o presente momento, somente uma cepa humana brasileira de genótipo G5P[8], o protótipo isolado em São Paulo no ano de 1992 (IAL28), possui o seu genoma completamente sequenciado e disponível em bancos de sequências online. Este isolado serviu de base comparativa para as análises realizadas neste estudo. A carência de sequências dos 11 genes de cepas humanas de genótipo G5 pode explicar o motivo pelo qual estudos anteriores ao novo sistema de classificação para os RVA correlacionarem sequências de VP7 de genótipo G5 provenientes de cepas humanas com o protótipo OSU, de origem suína, isolado os USA em 1975.

Dados na literatura descrevem casos de GA em crianças por infecção com RVA de genótipo G5P[6] em países como Bangladesh (Hashizume *et al.*, 2008) Bulgária (Mladenova *et al.*, 2012), China (Duan *et al.*, 2007), Japão (Komoto *et al.*, 2013) e Vietnam (Ahmed *et al.*, 2007) As análises realizadas demonstraram que estas cepas apresentam alguns genes de origem suína na sua constelação genética, de modo que as cepas G5P[6] que estão infectando crianças nos continentes africano, asiático e europeu

são fruto de eventos de *reassortment* entre cepas humanas e suínas. Diferentemente do encontrado nestes continentes, as cepas brasileiras de genótipo G5 são de especificidade G5P[8] e, para todos os demais genes, foi encontrada uma maior identidade genética com cepas de origem humana de diferentes continentes e genótipos, porém todos característicos da constelação genética *Wa-like* (G1P[8], G3P[8], G4P[8], G9P[8] e G12P[8]). Os resultados sugerem que o genótipo G5 já se encontrava bem adaptado em humanos no Brasil em 1986, de modo que se houve um evento de *reassortment* entre RVA humanos e suínos que deu origem a estas cepas aconteceu anteriormente ao ano de 1986.

As análises filogenéticas revelaram que o gene VP7 das cepas humanas Brasileiras circulou no Brasil a partir de 1986 (linhagem I), sofreu poucas alterações entre as sequências de aminoácidos deduzidas das cepas Brasileiras até o ano de 2005, ano em que foi descrita a última cepa humana G5 no Brasil, não havendo evidências de introdução de novas linhagens deste genótipo no país. Estudos envolvendo o gene que codifica para a VP7 de cepas de RVA de genótipo G5 infectando crianças na África, Ásia e Europa demonstram a estreita relação com cepas G5 de origem suína, como TJ4-5, CMP178 e CC134, demonstrando que a linhagem III de G5 está circulando nestes continentes atualmente (Ahmed *et al.*, 2007; Duan *et al.*, 2007; Mladenova *et al.*, 2012; Komoto *et al.*, 2013).

Na literatura foram descritas quatro linhagens para o genótipo P[8] (P[8]-1, P[8]-2, P[8]-3 e P[8]-4), referente à proteína VP8\* (Gouvea *et al.*, 1999; Cunliffe *et al.*, 2001; Arista *et al.*, 2005). Estudos prévios demonstraram a circulação de três linhagens de P[8] (P[8]-1, P[8]-2, e P[8]-3) em associação com diferentes genótipos G circulando no Brasil nas últimas décadas (Gouvea *et al.*, 1999; Araujo *et al.*, 2007; Tort *et al.*, 2010). Não existem estudos demonstrando a circulação de P[8]-4 na América Latina (Espínola *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2013). Corroborando os resultados prévios, dentre as diferentes linhagens de P[8] descritas no país, P[8]-1, P[8]-2 e P[8]-3 foram detectadas em associação com o genótipo G5 no Brasil. Cepas coletadas até o ano de 1990 agruparam no mesmo cluster de outras cepas G5 Brasileiras (IAL28, BR1054 e BRH8) dentro da linhagem P[8]-2. As cepas coletadas entre 1991 e 2005 agruparam na linhagem P[8]-1, juntamente com protótipos humanos de genótipo G1P[8]: Wa, Phim e L8. A única exceção foi a cepa rj454-96, que foi coletada no Rio de Janeiro em 1996, que agrupou juntamente com os protótipos B3458 (Matthijnssens *et al.*, 2008a),

MW279 e OP351 (Cunliffe *et al.*, 2001), ITA-MAR37 (Ansaldi *et al.*, 2007), rj4956/01 (Araujo *et al.*, 2007), rj1527/98, rj1609/98 e rj11759/98 (Tort *et al.*, 2010) (bootstrap de 100%), na linhagem P[8]-3. Estes resultados demonstram a grande variabilidade genética do genótipo P[8], que é encontrado em associação com os genótipos G mais detectados mundialmente nas últimas décadas. Essa diferenciação em linhagens pode ser uma explicação para o sucesso da fixação deste genótipo na população por tantos anos, porém são necessários estudos envolvendo a realização de ensaios de soroneutralização para se comprovar esta hipótese.

As sequências parciais dos genes que codificam para as proteínas VP1, VP2, VP3 e VP6 das cepas brasileiras de genótipo G5 pertencem ao genótipo R1, C1, M1 e I1, respectivamente, e apresentaram grande identidade genética com cepas protótipo de RVA humano de diferentes genótipos, como o IAL28 (G5P[8]), Hosokawa (G5P[8]), Wa (G1P[8]), P (G3P[8]), entre outros. As análises dos quatro genes demonstraram um padrão de agrupamento das cepas coletadas entre 1986 e 1996 e a cepa protótipo IAL28, enquanto as cepas coletadas entre 1998 e 2005 agruparam com os protótipos de RVA humano dos genótipos G que mais circulavam no país durante este período, como G1P[8], G3P[8], G4P[8] e G9P[8] (Leite *et al.*, 2008). Os resultados do alinhamento das sequências aminoacídicas destes genes demonstrou a existência de substituições não sinônimas entre cepas coletadas no mesmo período (cepas coletadas entre 1986-1996; e 1998-2005), sugerindo a existência de uma diferenciação genética de ordem temporal entre as sequências dos genes que codificam para VP1, VP2, VP3 e VP6.

A análise dos segmentos que codificam para as proteínas não estruturais das cepas G5 Brasileiras, assim como para os demais genes, demonstrou uma grande identidade genética entre as cepas brasileiras de genótipo G5 e protótipos humanos coletadas em diferentes continentes, porém característicos ao genótipo *Wa-like*. As análises dos genes de NSP1, NSP2 e NSP5 mostrou que as cepas Brasileiras G5 agrupam em duas linhagens distintas dos genótipos A1 (A1a e A1b), N1 (N1a e N1b) e H1 (H1a e H1b).

Concluindo, os resultados apresentados neste estudo demonstram que as cepas humanas de RVA de genótipo G5 são consequência de dois eventos independentes de transmissão, possivelmente de suínos. As cepas brasileiras apresentaram uma constelação genotípica estritamente *Wa-like*, com elevada identidade genética com

protótipos humanos de diferentes genótipos circulantes mundialmente ao passo que as cepas detectadas recentemente nos continentes Africano, Asiático e europeu apresentam alguns genes de origem suína, sendo fruto de eventos de *reassortment* humano-suíno.

### **1.3. Análise das linhagens de P[8] de rotavírus da espécie A circulando no Brasil de 1986 a 2011 (artigo 3)**

No presente estudo, um total de 135 cepas de genótipo P[8] associado aos genótipos G1, G3, G5 e G9 foi sequenciado, a fim de se avaliar a dinâmica das linhagens de P[8] circulantes no Brasil antes e após a introdução da vacina RV1 no PNI. O estudo envolveu cepas coletadas em diferentes regiões brasileiras durante o período de 1986 até 2011 e os resultados demonstraram que as linhagens P[8]-1, P[8]-2, e P[8]-3 circularam no país nas três últimas décadas em associação com os genótipos G mais detectados mundialmente (G1, G3, G4 e G9), corroborando dados da literatura, que reportaram a circulação das linhagens P[8]-1, P[8]-2 e P[8]-3 ao longo das últimas décadas em todo o mundo (Iturriza-Gomara *et al.*, 2000; Espinola *et al.*, 2008; Contreras *et al.*, 2011; Chaimongko *et al.*, 2012; Stupka *et al.*, 2012). A linhagem P[8]-4 não foi detectada no presente estudo e não há dados na literatura relatando a sua detecção na América do Sul (Araújo *et al.*, 2007; Espinola *et al.*, 2008; Tort *et al.*, 2010).

A análise filogenética do gene que codifica para VP8\* das cepas brasileiras de genótipo P[8] demonstrou a cocirculação de P[8]-1, P[8]-2 e P[8]-3 ao longo do estudo, especialmente em 2001, quando as três linhagens foram detectadas simultaneamente no Brasil e, até o momento este é o único relato da cocirculação simultânea das três linhagens na América do Sul. Este fenômeno foi descrito em estudos realizados no Reino Unido (P[8]-1 /P[8]-2 /P[8]-3) (Iturriza-Gomara *et al.* 2006, 2007) e Malawi (P[8]-2 /P[8]-3 /P[8]-4) (Cunliffe *et al.*, 2001). Não há estudos na literatura demonstrando a cocirculação das quatro linhagens de P[8] simultaneamente na mesma região.

Os resultados demonstraram que na linhagem P[8]-1 agruparam onze cepas brasileiras de genótipo G5 coletadas na década de 1990, cinco cepas brasileiras de genótipo G1 da década de 2000, incluindo três cepas de crianças vacinadas (se15901-08, ma19006-10 e ba13391-10), juntamente com a cepa vacinal (RV1). Na linhagem P[8]-2 agruparam dezesseis cepas brasileiras de genótipo G5 detectadas nas décadas de

1980/1990, oito cepas brasileiras de genótipo G1 coletadas entre 1986 e 1991 e três cepas Brasileiras de genótipo G9 coletadas em 2001. Parra *et al.* (2009) descreveu a detecção exclusiva do genótipo G9 associado à linhagem P[8]-3, diferindo dos resultados encontrados no presente estudo, onde G9 foi descrito em associação com P[8]-2 e P[8]-3.

A maioria das cepas brasileiras agrupou na linhagem P[8]-3 com protótipos isolados em diferentes continentes, corroborando estudos prévios que descreveram a circulação mundial desta linhagem em associação com diferentes genótipos G (Espínola *et al.*, 2008; Parra *et al.*, 2009; Tort *et al.*, 2010; Oh *et al.*, 2012). Esta linhagem foi descrita pela primeira vez no Brasil em uma amostra de genótipo G5 coletada no Rio de Janeiro em 1996 e a partir de então se mantém na população Brasileira. É importante destacar que, com exceção de alguns casos de sequências de crianças vacinadas, a linhagem P[8]-3 é a única linhagem detectada no Brasil após a introdução da RV1, de especificidade P[8]-1.

Mediante a variabilidade encontrada na linhagem P[8]-3, no presente estudo foi proposta a classificação desta linhagem em seis diferentes sublinhagens (P[8]-3.1 – P[8]-3.6). É importante ressaltar que as sublinhagens P[8]-3.5 e P[8]-3.6 só circularam no Brasil após a introdução da RV1. Imbert-Marcille *et al.* (2013) descreveram a circulação das sublinhagens P[8]-3.5 e P[8]-3.6 na França em cepas de crianças hospitalizadas com GA entre os anos de 2011 e 2013. A análise dos sítios antigênicos não demonstrou substituições específicas entre as sublinhagens descritas. São necessários mais estudos envolvendo a análise de cepas de genótipo P[8] circulando no Brasil e mundialmente para se entender o padrão de dispersão das sublinhagens de P[8]-3.

O presente estudo contribui para uma melhor compreensão da dinâmica e padrão de circulação das linhagens e sublinhagens de P[8]-3 no Brasil. As duas vacinas RVA licenciadas no país (RV1 e RV5) contém o genótipo P[8] em suas composições, no entanto a linhagem que circula atualmente (P[8]-3) difere das linhagens contempladas nas duas vacinas RV1 (P[8]-1) e RV5 (P[8]-2). Esta diferenciação de P[8] em linhagens/sublinhagens pode ser resultado de um ou mais mecanismos geradores de variabilidade e os presentes resultados sugerem que o genótipo P[8] possa estar escapando do sistema imunológico se diferenciando em linhagens e sublinhagens

através do mecanismo de mutação pontual. Porém, estudos envolvendo ensaios de soroneutralização dessas cepas são necessários para melhor elucidar estas observações.

#### **1.4. Análise da constelação gênica de cepas brasileiras de genótipo G1P[8] circulando no Brasil entre 1986 e 2013**

Dados epidemiológicos vêm demonstrando na literatura a circulação do genótipo G1P[8] mundialmente nas últimas décadas, com taxas de detecção variáveis sendo detectado em maior proporção nos países desenvolvidos quando comparado aos países em desenvolvimento, onde há uma maior variabilidade genotípica entre as cepas de RVA (Gentsch *et al.*, 2005; Parashar *et al.*, 2006; Iturriza-Gomara *et al.*, 2011; De Grazia *et al.*, 2014; Pursem *et al.*, 2014). Estudos envolvendo análises de cepas de RVA Brasileiras descrevem a circulação do genótipo G1P[8] em todo o território Brasileiro desde a década de 1980 (Araújo *et al.*, 2007; Leite *et al.*, 2008; Munford *et al.*, 2009). Os resultados demonstraram a flutuação do genótipo G1P[8] entre crianças Brasileiras com GA evidenciando o sucesso da fixação deste genótipo na população, uma vez que circula no país há três décadas e permanece sendo detectado, mesmo após a introdução da vacina RV1 (especificidade G1P[8]) no calendário nacional de imunizações.

Durante os 27 anos de monitoramento, a prevalência do genótipo G1P[8] variou anualmente, com variação na sua frequência relativa. Os resultados demonstram picos de detecção de G1P[8] nos períodos de 1994-1995, 1997-1998, 2000-2004 e 2008-2009. Em um estudo prévio, Giammanco *et al.* (2014), demonstraram as combinações genotípicas GP[ ] mais detectadas em Palermo, Itália, no período compreendido entre 1985 e 2011, descrevendo que o genótipo G1P[8] apresentou um perfil de flutuação de detecção ao longo do tempo semelhante ao encontrado no presente estudo. É interessante mencionar que, apesar da prevalência de G1P[8] semelhante entre as populações brasileiras e italianas, as crianças brasileiras são vacinadas com RV1, de especificidade G1P[8], desde março de 2006, ao passo que as crianças italianas não são vacinadas contra RVA, sugerindo que a vacinação em massa pela RV1 no Brasil pode não ter afetado a circulação do genótipo G1P[8] no país. Entretanto, Palermo é a maior cidade da ilha da Sicília e a quinta cidade mais populosa de toda a Itália (cerca de 1 036 954 habitantes), além de ser uma região que recebe muitos turistas anualmente e esse importe de turistas não permite a exclusão do efeito de vacinação em rebanho entre

as crianças de Palermo. São necessários mais estudos com uma coorte maior de crianças italianas para se confirmar esta hipótese.

As análises das constelações genéticas de noventa cepas brasileiras de genótipo G1P[8] coletadas em diferentes regiões do país nos períodos pré e pós-vacinação em massa pela RV1 demonstraram que todas as cepas pertencem ao genótipo *Wa-like*, com a constelação I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1, com exceção de duas cepas (rj14055-07 e ba19030-10) coletadas após a introdução da RV1 no país que apresentaram o genótipo T3 (NSP3), com 100% de identidade com o protótipo felino AU-1, característico do genótipo AU-1-like. Estudos descreveram a importância do novo sistema de classificação baseado na análise dos onze genes para demonstrar a ocorrência de eventos de reassortment entre cepas de genótipos caracteristicamente animais, como o *AU-1-like* e humanos, como o *Wa-like* (Heiman et al., 2008). Matthijnsens & Van Ranst (2012) sugerem que apenas cepas de duas constelações genotípicas (*Wa-like* e *DS-1-like*) foram bem sucedidas em se fixarem na população humana ao longo dos anos, de modo que o processo de formação destas constelações gênicas heterólogas precisa ser mais estudado.

O fenômeno de reassortment entre cepas selvagens e vacinal já foi descrito para a RV1 no Brasil (Rose et al., 2013) e para a RV5 em diferentes países como Austrália (Donato et al., 2012), Finlândia (Hemming & Vesikari, 2013b), Nicarágua (Bucardo et al., 2012) e USA (Payne et al., 2010).

No presente estudo, uma cepa (se15901-08) foi coletada de uma criança de dois meses de idade que foi imunizada com RV1 sete dias antes de ser hospitalizada. A análise dos 11 segmentos do genoma desta cepa demonstrou a identidade nucleotídica de 100% com a cepa vacinal RV1, evidenciando o evento de shedding vacinal. Anderson et al. (2008) descreveram o shedding vacinal entre 35-80% das crianças saudáveis sete dias após receberem a primeira dose e 11-29% após a segunda dose. Desta maneira, a cepa vacinal eliminada na natureza pelas crianças vacinadas pode oferecer uma proteção às crianças não vacinadas, consequentemente amplificando a cobertura vacinal a partir do “efeito rebanho” (Rivera et al., 2011). Além disso, estudos realizados na Austrália, Austrália, Brasil, e El Salvador descreveram a diminuição de casos de GA graves por RVA tanto em crianças vacinadas quanto em crianças não vacinadas sugerindo que a redução da transmissão de RVA pela população vacinada



pode beneficiar os membros não vacinados da comunidade (Patel *et al.*, 2012). Durante um estudo de vigilância epidemiológica de cinco anos realizado na Hungria, Laszlo *et al.* (2012) identificaram 55 cepas de genótipo G1P[8] coletadas de crianças não vacinadas apresentando uma elevada identidade nucleotídica com a cepa vacinal RV1, sugerindo a ocorrência do efeito rebanho da vacinação em crianças húngaras.

A análise filogenética do gene que codifica para a proteína VP8\* revelou que o genótipo G1 circulou associado a diferentes linhagens de P[8] no Brasil durante os 27 anos de estudo. Os resultados demonstraram que a linhagem P[8]-3 parece ser a única linhagem circulando no país, enquanto a linhagem de P[8] contida na vacina RV1 é a P[8]-1. Em um estudo realizado na Finlândia, Hemming & Vesikari (2013) também reportaram uma grande circulação de P[8]-3 associado à G1 em um estudo de vigilância epidemiológico de vinte anos. Resultados semelhantes foram descritos por Imbert-Marcille *et al.* (2013) demonstrando a circulação de duas sublinhagens de P[8]-3 em 62 crianças com GA na França nos anos de 2010, 2011 e 2012.

O presente estudo contribui para um melhor entendimento a respeito da dinâmica, do padrão evolutivo de cepas de genótipo G5P[8] e G1P[8] e reforça a importância de estudos de constante vigilância dos genótipos de RVA circulantes no intuito de se monitorar os genótipos circulantes, a caracterização de novas variantes genotípicas ou até o surgimento de novos genótipos e o potencial de dispersão na população. Estes estudos deveriam ser implementados, principalmente, em países que adotaram ou estudam a adoção de um esquema de vacinação em massa contra RVA como medida preventiva em seus calendários de vacinação, uma vez que com o conhecimento prévio a respeito do perfil epidemiológico da população pode-se avaliar a escolha da vacina mais adequada ou até mesmo a proposta do melhoramento de uma vacina disponível. No caso brasileiro, o genótipo G5 está circulando em diferentes continentes em associação com o genótipo P[6] e não existem estudos a respeito da eficácia das duas vacinas utilizadas mundialmente (RV1 e RV5) frente ao genótipo G5P[6], além do genótipo G1P[8], que mesmo fazendo parte da composição das duas vacinas disponíveis permanece sendo descrito mundialmente.

Portanto, a melhoria dos programas de vigilância de RVA através de estudos que incluam a análise dos 11 segmentos gênicos das cepas circulantes no país contribuirá para entender melhor alguns pontos ainda não esclarecidos a respeito da biologia dos

vírus, como de que maneira a introdução de um esquema de vacinação em massa pode influenciar na circulação de RVA em humanos e animais e a real frequência de detecção de eventos de reassortment entre cepas de espécies diferentes ou entre cepas selvagem e vacinal na população.

## 2. CONCLUSÕES

- A análise de cepas de RVA de genótipo G5 baseada no gene que codifica para a proteína VP7 identificou a circulação de três linhagens mundialmente;
- Todas as cepas brasileiras de genótipo G5P[8] analisadas apresentaram uma constelação genética *Wa-like*: G5-P[8]-I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1;
- No Brasil, G5 circulou em associação com três linhagens de P[8] entre 1986 e 2005 (P[8]-1, P[8]-2 e P[8]-3), demonstrando um padrão de agrupamento de ordem temporal para alguns dos genes analisados;
- A análise da dinâmica do genótipo P[8] no Brasil demonstrou que três linhagens circularam no país entre 1986 e 2013 (P[8]-1, P[8]-2 e P[8]-3);
- Foi demonstrado que a linhagem P[8]-3 que circula no Brasil atualmente, difere da linhagem contida na vacina RV1 (P[8]-1) e uma nova classificação de P[8]-3 em seis sublinhagens foi proposta;
- A análise dos 11 genes das cepas de RVA de genótipo G1P[8] demonstrou que todas apresentam constelação genética *Wa-like*, de especificidade I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1, com exceção de duas cepas que apresentaram *reassortment* no gene de NSP3, sendo de genótipo T3, comum a cepas do genótipo *AU-1-like*;
- A introdução da vacina RV1 no calendário de vacinações no Brasil parece não ter influenciado na circulação do genótipo G1P[8] no país, uma vez que a flutuação deste genótipo demonstrou ser semelhante à de países onde a vacinação não foi introduzida.

### 3. PERSPECTIVAS

No intuito de contribuir para os avanços nos estudos da diversidade genética dos RVA, constituirão objetivos futuros: i) monitoramento da diversidade genotípica dos RVA no Brasil, em especial os genótipos G1P[8], genótipo contido nas duas vacinas licenciadas no país e G5, que possivelmente pode reemergir no país uma vez que está circulando na África, Ásia e Europa; ii) vigilância de cepas de RVA de crianças imunizadas com a RV5, no intuito de se detectar eventuais casos de *reassortment* em crianças brasileiras, como já descrito em outros países; iii) análise filogenética de cepas brasileiras de genótipo G12, cuja expansão global tem sido demonstrada na última década; e iv) monitoramento de possíveis casos de *reassortment* entre cepas selvagem de origem humana e origem animal.

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Afrad MH, Matthijnssens J, Moni S, Kabir F, Ashrafi A, Rahman MZ, Faruque AS, Azim T, Rahman M. Genetic characterization of a rare bovine-like human VP4 mono-reassortant G6P[8] rotavirus strain detected from an infant in Bangladesh. *Infect Genet Evol.* 2013 Oct;19:120-6.

Afrikanova I, Fabbretti E, Miozzo MC, Burrone OR. Rotavirus NSP5 phosphorylation is up-regulated by interaction with NSP2. *J. Gen. Virol.* 1998;79, 2679–2686.

Ahmed, K, Anh, D.D and Nakagomi, O. (2007). Rotavirus G5P[6] in child with diarrhea, Vietnam. *Emerg Infect Dis* 13(8), 1232-5.

Alfieri, A. A., Leite, J. P., Nakagomi, O., Kaga, E., Woods, P. A., Glass, R. I. & Gentsch, J. R. Characterization of human rotavirus genotype P[8]G5 from Brazil by probe-hybridization and sequence. *Arch Virol* 1996: 141, 2353-2364.

Amarilla A, Espínola EE, Galeano ME, Fariña N, Russomando G, Parra GI. 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.* 2007;13: CR333-7

Anderson EJ, Weber SG. Rotavirus infections in adults. *Lancet Infect Dis.* 2004;4(2):91e9.

Anderson EJ. Rotavirus vaccines: viral shedding and risk of transmission. *Lancet Infect Dis.* 2008;8:642-9

Angel J, Franco MA, Greenberg HB. Rotavirus immune responses and correlates of protection. *Curr Opin Virol.* 2012;2(4):419-25.

Ansaldi F, Pastorino B, Valle L, Durando P, Sticchi L, Tucci P, Biasci P, Lai P, Gasparini R, Icardi G. 2007. Molecular characterization of a new variant of rotavirus P[8]G9 predominant in a sentinel-based survey in central Italy. *J Clin Microbiol* 45(3):1011-1015.

Aoki ST, Settembre EC, Trask SD, Greenberg HB, Harrison SC, Dormitzer PR. Structure of rotavirus outer-layer protein VP7 bound with a neutralizing Fab. *Science.* 2009; 324(5933):1444-7.

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

Araújo IT, Assis RMS, Fialho AM, Mascarenhas JDAP, Heinemann MB, Leite JPG. 2007. Brazilian P[8],G1, P[8],G5, P[8],G9, and P[4],G2 rotavirus strains: Nucleotide sequence and phylogenetic analysis. *Journal of Medical Virology* 79(7):995-1001.

Arista S, Giammanco GM, De Grazia S, Ramirez S, Lo Biundo C, Colomba C, Cascio A, Martella V. 2006. Heterogeneity and Temporal Dynamics of Evolution of G1 Human Rotaviruses in a Settled Population. *J Virol* 80(21):10724-10733.

Arias CF, Romero P, Alvarez V, Lopez S. Trypsin activation pathway of rotavirus infectivity. *J Virology.* 1996; 70(9):5832-9.

Arias CF, Dector MA, Segovia L, López T, Camacho M, Isa P, Espinosa R, López S. RNA silencing of rotavirus gene expression. *Virus Res.* 2004;102(1):43-51.

Atherly DE, Lewis KD, Tate J, Parashar UD, Rheingans RD. Projected health and economic impact of rotavirus vaccination in GAVI-eligible countries: 2011-2030. *Vaccine.* 2012; A7-A14.

Baker TS, Olson NH, Fuller SD. Adding the third dimension to virus life cycles: three-dimensional reconstruction of icosahedral viruses from cryo-electron micrographs. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1999;63(4):862-922.

Ball LA. The universal taxonomy of viruses in theory and practice. In: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA, editors. *Virus Taxonomy: Eight Report of the International Committee on taxonomy of Viruses.* Elsevier, Academic Press; Amsterdam, Holland: 2005. p. 3-8.

Barril P, Martínez L, Giordano M, Masachessi G, Isa M, Pavan J, Glikmann G, Nates S. Genetic and antigenic evolution profiles of G1 rotaviruses in Córdoba, Argentina, during a 27-year period (1980-2006). *J Med Virol.* 2013 Feb;85(2):363-9.

Barro M, Patton JT. Rotavirus nonstructural protein 1 subverts innate immune response by inducing degradation of IFN regulatory factor 3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2005; 102:4114-9.

Barros FC, Matijasevich A, Requejo JH, Giugliani E, Maranhão AG, Monteiro CA, Barros AJ, Bustreo F, Merialdi M, Victora CG. Recent trends in maternal, newborn, and child health in Brazil: progress toward Millennium Development Goals 4 and 5. *Am J Public Health*. 2010;100(10):1877-89.

Beards, G., Xu, L., Ballard, A., Desselberger, U., and McCrae, M. A. A serotype 10 human rotavirus. *J Clin Microbiol* 1992; 30(6), 1432-5.

Benati FJ, Maranhão AG, Lima RS, da Silva RC, Santos N. Multiple-gene characterization of rotavirus strains: evidence of genetic linkage among the VP7-, VP4-, VP6-, and NSP4-encoding genes. *J Med Virol*. 2010 Oct;82(10):1797-802.

Bernstein DI. Rotavirus overview. *Pediatr Infect Dis J*. 2009; 28 (Suppl 3): S50-S53.

Bhan MK, Lew JF, Sazawal S, Das BK, Gentsch JR, Glass RI. Protection conferred by neonatal rotavirus infection against subsequent rotavirus diarrhea. *J Infect Dis*. 1993;168(2):282-7.

Bishop RF, Davidson GP, Holmes IH, Ruck BJ. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. *Lancet*. 1973;2(7841):1281-3.

Black RE, Cousens S, Johnson HL, Lawn JE, Rudan I. et al. Global, regional, and national causes of child mortality in 2008: a systematic analysis. *Lancet*. 2010;375:1969–1987.

Bok K, Castagnaro N, Borsa A, Nates S, Espul C, Fay O, Fabri A, Grinstein S, Miceli I, Matson DO, Gómez J. Surveillance for rotavirus in Argentina. *J Med Virol*. 2001 Sep; 65(1):190-8.

Boshuizen JA, Rossen JW, Sitaram CK, Kimenai FF, Simons-Oosterhuis Y, Laffeber C et al. Rotavirus enterotoxin NSP4 binds to the extracellular matrix proteins laminin-beta3 and fibronectin. *J Virol*. 2004; 78(18):10045-53.

Both GW, Bellamy AR, Mitchell DB. Rotavirus protein structure and function. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1994;185:67-105.

Brown KH, Peerson JM, Baker SK, Hess SY. Preventive zinc supplementation among infants, preschoolers, and older prepubertal children. *Food Nutr Bull*. 2009;30:S12–S40.

Bucardo F, Rippinger CM, Svensson L, Patton JT. Vaccine-derived NSP2 segment in rotaviruses from vaccinated children with gastroenteritis in Nicaragua. *Infect Genet Evol.* 2012;12(6):1282-94.

Burns JW, Siadat-Pajouh M, Krishnaney AA, Greenberg HB. Protective effect of rotavirus VP6-specific IgA monoclonal antibodies that lack neutralizing activity. *Science.* 1996;272(5258):104-7.

Campagna M, Eichwald C, Vascotto F, Burrone OR. RNA interference of rotavirus segment 11 mRNA reveals the essential role of NSP5 in the virus replicative cycle. *J. Gen. Virol.* 2005;86,1481–1487.

Caprio RV, Gonzalez-Nilo FD, Riadi G, Taraporewala ZF, Patton JT. Histidine triad-like motif of the rotavirus NSP2 octamer mediates both RTPase and NTPase activities. *J. Mol. Biol.* 2006;362,539–554.

Cardoso das D, Soares CM, Azevedo MS, Leite JP, Munford V, Rácz ML. Serotypes and subgroups of rotavirus isolated from children in central Brazil. *Journal of Health, Population, and Nutrition.* 2000, 18(1):39-43.

Carvalho-Costa FA, Assis RM, Fialho AM, Bóia MN, Alves DP, Martins CM, Leite JP. Detection and molecular characterization of group A rotavirus from hospitalized children in Rio de Janeiro, Brazil, 2004. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007 May;101(3):291-4.

Carvalho-Costa FA, Araújo IT, Santos de Assis RM, Fialho AM, de Assis Martins CM, Bóia MN et al. Rotavirus genotype distribution after vaccine introduction, Rio de Janeiro, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2009;15(1):95-7.

Carvalho-Costa FA, Volotão Ede M, de Assis RM, Fialho AM, de Andrade Jda S, Rocha LN et al. Laboratory-based rotavirus surveillance during the introduction of a vaccination program, Brazil, 2005-2009. *Pediatr Infect Dis Journal.* 2011;30(1):S35-41

Castello AA, Nakagomi T, Nakagomi O, Jiang B, Kang JO, Glass RI et al. Characterization of genotype P[9]G12 rotavirus strains from Argentina: high similarity with Japanese and Korean G12 strains. *J Med Virol.* 2009 Feb;81(2):371-81.



- Chemello ME, Aristimuño OC, Michelangeli F, Ruiz MC. Requirement for vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase activity and Ca<sup>2+</sup> gradient during entry of rotavirus into MA104 cells. *J Virol.* 2002;76(24):13083-7.
- Cheuvart B, Friedland LR, Abu-Elyazeed R, Han HH, Guerra Y, Verstraeten T. *Pediatr Infect Dis J.* 2009; 28 (3): E1-E8.
- Ciarlet M, Estes M. Rotaviruses: basic biology, epidemiology and methodologies. In: Britton G, editor. *Encyclopedia of Environmental Microbiology.* John Wiley & Sons; New York. 2002. p. 2573-773.
- Coluchi N, Munford V, Manzur J, Vazquez C, Escobar M, Weber E, Mármol P, Rácz ML. Detection, subgroup specificity, and genotype diversity of rotavirus strains in children with acute diarrhea in Paraguay. *J Clin Microbiol.* 2002 May; 40(5):1709-14.
- Conner, M.E. & Ramig, R.F. Viral Enteric Diseases. In: *Viral Pathogenesis*, ed. by Neal Nathanson et al., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1997. 713-743.
- Contreras JF, Menchaca GE, Infante R, Hernández CE, Rodríguez C, Tamez RS. Evidence of conserved epitopes in variable region of VP8\* subunit of VP4 protein of rotaviruses of P[8]-1 and P[8]-3 lineages. *Acta Virol.* 2011;55(3):273-8.
- Cook, N., Bridger, J., Kendall, K., Gomara, M. I., El-Attar, L. & Gray, J. The zoonotic potential of rotavirus. *J Infect* 2004: 48, 289-302.
- Cowley D, Donato CM, Roczo-Farkas S, Kirkwood CD. Novel G10P[14] rotavirus strain, northern territory, Australia. *Emerg Infect Dis.* 2013 Aug;19(8):1324-7.
- Cunliffe NA, Gondwe JS, Graham SM, Thindwa BD, Dove W, Broadhead RL, Molyneux ME, Hart CA. 2001. Rotavirus strain diversity in Blantyre, Malawi, from 1997 to 1999. *J Clin Microbiol* 39:836-843.
- Davidson GP, Bishop RF, Townley RR, Holmes IH. Importance of a new virus in acute sporadic enteritis in children. *Lancet.* 1975;1(7901):242-6.

De Grazia S, Bonura F, Colomba C, Cascio A, Di Bernardo F, Collura A, Terranova DM, Martella V, Giammanco GM. Data mining from a 27-years rotavirus surveillance in Palermo, Italy. *Infect Genet Evol.* 2014 Mar 12. pii: S1567-1348(14)00083-5.

Dennehy, P.H. Treatment and prevention of rotavirus infection in children. *Curr Infect Dis Rep.* 2013; 15(3): 242-250.

Desselberger, U. Genome rearrangements of rotaviruses. *Adv Virus Res* 1996: 46, 69-95.

de Oliveira ASL, Mascarenhas JDP, Soares LS, Guerra SFS, Gabbay YB, Sanchez NO et al. Reemergence of G2 rotavirus serotypes in Northern Brazil reflects a natural changing pattern over time. The 8th Rotavirus International Symposium, Istanbul, Turkey, Abstracts. 2008: p. 60-61.

do Carmo GM, Yen C, Cortes J, Siqueira AA, de Oliveira WK, Cortez-Escalante JJ, Lopman B, Flannery B, de Oliveira LH, Carmo EH, Patel M. Decline in diarrhea mortality and admissions after routine childhood rotavirus immunization in Brazil: a time-series analysis. *PLoS Med.* 2011;8(4):e1001024.

Domingues AL, Morais AT, Cruz RL, Moreira LP, Gouvêa VS. Rotavirus-associated infantile diarrhea in Uberaba, Minas Gerais, on the wake of the Brazilian vaccination program. *J Clin Virol.* 2008 Nov;43(3):298-301.

Donato CM, Ch'ng LS, Boniface KF, Crawford NW, Buttery JP, Lyon M, Bishop RF, Kirkwood CD. Identification of strains of RotaTeq rotavirus vaccine in infants with gastroenteritis following routine vaccination. *J Infect Dis.* 2012 Aug 1;206(3):377-83.

Dormitzer PR, Nason EB, Prasad BV, Harrison SC. Structural rearrangements in the membrane penetration protein of a non-enveloped virus. *Nature.* 2004;430(7003):1053-8.

Duan, Z. J., Li, D. D., Zhang, Q., Liu, N., Huang, C. P., Jiang, X., Jiang, B., Glass, R., Steele, D., Tang, J. Y., Wang, Z. S., and Fang, Z. Y. Novel human rotavirus of genotype G5P[6] identified in a stool specimen from a Chinese girl with diarrhea. *J Clin Microbiol* 2007: 45(5), 1614-7.

El Khoury AC, Mast TC, Ciarlet M, Markson L, Goveia MG, Munford V, Rácz ML. Projecting the effectiveness of RotaTeq<sup>®</sup> against rotavirus-related hospitalisations in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011 Aug;106(5):541-5.

Esona, M. D., Geyer, A., Banyai, K., Page, N., Aminu, M., Armah, G. E., Hull, J., Steele, D. A., Glass, R. I., and Gentsch, J. R.. Novel human rotavirus genotype G5P[7] from child with diarrhea, Cameroon. *Emerg Infect Dis* 2009: 15(1), 83-6.

Esona MD, Steele D, Kerin T, Armah G, Peenze I, Geyer A, Page N, Nyangao J, Agbaya VA, Trabelsi A, Tsion B, Aminu M, Sebunya T, Dewar J, Glass R, Gentsch J. Determination of the G and P types of previously nontypeable rotavirus strains from the African Rotavirus Network, 1996-2004: Identification of unusual G types. *J Infect Dis*. 2010c;202 Suppl:S49-54.

Espínola EE, Amarilla A, Arbiza J, Parra GI. Sequence and phylogenetic analysis of the VP4 gene of human rotaviruses isolated in Paraguay. *Arch Virol*. 2008;153(6):1067-73.

Estes MK. Rotavirus and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE (Eds), *Fields Virology*, 4th ed. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, 2001. p. 1747-85.

Estes MK, Greenberg HB. Rotaviruses. *Fields Virology*. 6th edição. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia; 2013.

Ferrera A, Quan D, Espinoza F. Increased prevalence of genotype G2P(4) among children with rotavirus-associated gastroenteritis in Honduras. The 17th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases ICC, Munich, Germany, 2007.

Fischer TK, Valentiner-Branth P, Steinsland H, Perch M, Santos G, Aaby P, Mølbak K, Sommerfelt H. Protective immunity after natural rotavirus infection: a community cohort study of newborn children in Guinea-Bissau, west Africa. *J Infect Dis*. 2002;186(5):593-7.

Flewett TH, Davies H, Bryden AS, Robertson MJ. Diagnostic electron microscopy of faeces. II. Acute gastroenteritis associated with reovirus-like particles. *J Clin Pathol*. 1974;27(8):608-14.

Flewett, T. H. & Woode, G. N. The rotaviruses. *Arch Virol* 1978; 57, 1-23.

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

Gabbay YB, Borges AA, Oliveira DS, Linhares AC, Mascarenhas JDP, Barardi CRM, Simoes CMO, Wang Y, Glass RI, Jiang B. Evidence for zoonotic transmission of group C rotavirus among children in Belem, Brazil. *J Med Virol*. 2008;80(9):1666-74.

Gentsch JR, Laird AR, Bielfelt B, Griffin DD, Banyai K, Ramachandran M, Jain V, Cunliffe NA, Nakagomi O, Kirkwood CD, Fischer TK, Parashar UD, Bresee JS, Jiang B, Glass RI. Serotype diversity and reassortment between human and animal rotavirus strains: implications for rotavirus vaccine programs. *J Infect Dis*. 2005;192 Suppl 1:S146-59.

Giammanco GM, Bonura F, Zeller M, Heylen E, Van Ranst M, Martella V, Bányai K, Matthijnssens J, De Grazia S. Evolution of DS-1-like human G2P[4] rotaviruses assessed by complete genome analyses. *J Gen Virol*. 2014 Jan;95(Pt 1):91-109.

Gladstone BP, Ramani S, Mukhopadhyaya I, Muliylil J, Sarkar R, Rehman AM, Jaffar S, Gomara MI, Gray JJ, Brown DW, Desselberger U, Crawford SE, John J, Babji S, Estes MK, Kang G. Protective effect of natural rotavirus infection in an Indian birth cohort. *N Engl J Med*. 2011;365(4):337-46.

Gómez MM, Volotão EM, de Mendonça MC, Tort LF, da Silva MF, Leite JP. Detection of uncommon rotavirus A strains P[8]G8 and P[4]G8 in the city of Rio de Janeiro, 2002. *J Med Virol*. 2010 Jul;82(7):1272-6.

Gómez MM, de Mendonça MC, Volotão Ede M, Tort LF, da Silva MF, Cristina J et al. Rotavirus A genotype P[4]G2: genetic diversity and reassortment events among strains circulating in Brazil between 2005 and 2009. *J Med Virol*. 2011;83(6):1093-106.

Gómez MM, da Silva MF, Zeller M, Heylen E, Matthijnssens J, Ichihara MY et al. Phylogenetic analysis of G1P[6] group A rotavirus strains detected in Northeast

Brazilian children fully vaccinated with Rotarix™. *Infect Genet Evol.* 2013 Oct;19:395-402.

Gómez MM, Resque HR, Volotão EM, Rose TL, Silva MFM, Heylen E, Zeller M, Matthijnssens J and Leite JPG. Distinct evolutionary origins of G12P[8] and G12P[9] group A rotavirus strains circulating in Brazil. *Infect Genet Evol.* 2014. *In press.*

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

Gouvea, V. and Brantly, M. Is rotavirus a population of reassortants? *Trends Microbiol* 1995; 3(4), 159-62.

Gouvea V, Lima RCC, Linhares RE, Clark HF, Nosawa CM, Santos N. Identification of two lineages (WA-like and F45-like) within the major rotavirus genotype P[8]. *Virus Research* 1999; 59(2):141-147.

Graff JW, Ettayebi K, Hardy ME. Rotavirus NSP1 inhibits NFkappaB activation by inducing proteasome-dependent degradation of beta-TrCP: a novel mechanism of IFN antagonism. *PLoS Pathog.* 2009;5(1):e1000280.

Greenberg HB, Estes MK. Rotaviruses: from pathogenesis to vaccination. *Gastroenterology.* 2009;136(6):1939-51.

Guerrero CA, Méndez E, Zárate S, Isa P, López S, Arias CF. Integrin alpha(v)beta(3) mediates rotavirus cell entry. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(26):14644-9.

Guerrero CA, Moreno LP. Rotavirus receptor proteins Hsc70 and integrin  $\alpha v \beta 3$  are located in the lipid microdomains of animal intestinal cells. *Acta Virol.* 2012;56(1):63-70.

Gurgel RQ, Cuevas LE, Vieira SC, Barros VC, Fontes PB, Salustino EF et al. Predominance of rotavirus P[4]G2 in a vaccinated population, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2007 Oct;13(10):1571-3.

Hagbom M, Istrate C, Engblom D, Karlsson T, Rodriguez-Diaz J, Buesa J, Taylor JA, Loitto VM, Magnusson KE, Ahlman H, Lundgren O, Svensson L. Rotavirus stimulates release of serotonin (5-HT) from human enterochromaffin cells and activates

brain structures involved in nausea and vomiting. *PLoS Pathog.* 2011 Jul;7(7):e1002115.

Hashizume, M., Armstrong, B., Wagatsuma, Y., Faruque, A. S., Hayashi, T., and Sack, D. A. Rotavirus infections and climate variability in Dhaka, Bangladesh: a time-series analysis. *Epidemiol Infect* 2008: 136(9), 1281-9.

Hassine-Zaafrane M1, Sdiri-Loulizi K, Ben Salem I, Kaplon J, Ayouni S, Ambert-Balay K, Sakly N, Pothier P, Aouni M. The molecular epidemiology of circulating rotaviruses: three-year surveillance in the region of Monastir, Tunisia. *BMC Infect Dis.* 2011 Oct 3;11:266.

Heiman EM, McDonald SM, Barro M, Taraporewala ZF, Bar-Magen T, Patton JT. Group A human rotavirus genomics: evidence that gene constellations are influenced by viral protein interactions. *J Virol.* 2008; 82(22):11106-16.

Hemming M, Vesikari T. Genetic diversity of G1P[8] rotavirus VP7 and VP8\* antigens in Finland over a 20-year period: No evidence for selection pressure by universal mass vaccination with RotaTeq<sup>®</sup> vaccine. *Infect Genet Evol.* 2013 Oct;19:51-8.

Hemming M, Vesikari T. Detection of Rotateq<sup>®</sup> Vaccine-Derived Double Reassortant Rotavirus in a 7-Year-Old Child with Acute Gastroenteritis. *Pediatr Infect Dis J.* 2013 Dec 9 (19) 51-58.

Hoshino Y, Saif LJ, Sereno MM, Chanock RM, Kapikian AZ. Infection immunity of piglets to either VP3 or VP7 outer capsid protein confers resistance to challenge with a virulent rotavirus bearing the corresponding antigen. *J Virol.* 1988;62(3):744-8

Imbert-Marcille BM, Barbé L, Dupé M, Le Moullac-Vaidye B, Besse B, Peltier C et al. A FUT2 Gene Common Polymorphism Determines Resistance to Rotavirus A of the P[8] Genotype. *J Infect Dis.* 2013 Dec 29.

International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV. Url: <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>. Acesso em 10/11/2013 às 19:00h.

Iturriza-Gomara M, Green J, Brown DW, Desselberger U, Gray JJ. Diversity within the VP4 gene of rotavirus P[8] strains: implications for reverse transcription-PCR genotyping. *J Clin Microbiol* 2000: 38:898–901.

Iturriza-Gómara M, Wong C, Blome S, Desselberger U, Gray J. Molecular characterization of VP6 genes of human rotavirus isolates: correlation of genogroups with subgroups and evidence of independent segregation. *J Virol.* 2002;76(13):6596-601.

Iturriza Gómara M, Simpson R, Perault AM, Redpath C, Lorgelly P, Joshi D, Mugford M, Hughes CA, Dalrymple J, Desselberger U, Gray J. Structured surveillance of infantile gastroenteritis in East Anglia, UK: incidence of infection with common viral gastroenteric pathogens. *Epidemiol Infect.* 2008 Jan;136(1):23-33.

Iturriza-Gómara M, Dallman T, Bányai K, Böttiger B, Buesa J, Diedrich S et al. Rotavirus genotypes co-circulating in Europe between 2006 and 2009 as determined by EuroRotaNet, a pan-European collaborative strain surveillance network. *Epidemiol Infect.* 2011 Jun;139(6):895-909.

Jain, V., Das, B. K., Bhan, M. K., Glass, R. I. & Gentsch, J. R. Great diversity of group A rotavirus strains and high prevalence of mixed rotavirus infections in India. *J Clin Microbiol* 2001: 39, 3524-3529.

James VL, Lambden PR, Deng Y, Caul EO, Clarke IN. Molecular characterization of human group C rotavirus genes 6, 7 and 9. *J Gen Virol.* 1999;80(12):3181-7.

Jiang B, Gentsch JR, Glass RI. The role of serum antibodies in the protection against rotavirus disease: an overview. *Clin Infect Dis.* 2002;34(10):1351-61.

Johne R, Otto P, Roth B, Löhren U, Belnap D, Reetz J, Trojnar E. Sequence analysis of the VP6-encoding genome segment of avian group F and G rotaviruses. *Virology.* 2011;412(2):384-91.

Jourdan N, Maurice M, Delautier D, Quero AM, Servin AL, Trugnan G. Rotavirus is released from the apical surface of cultured human intestinal cells through nonconventional vesicular transport that bypasses the Golgi apparatus. *J Virol.* 1997 Nov;71(11):8268-78.

Kapikian AZ, et al. Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *Journal of Virology.* 1972. 10(5):1075-81.

Kapikian, A.Z, Hoshino, Y., Chanock, R.M. Rotaviruses. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, editors. *Fields Virology*. 4th. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001: p.1787-833.

Kirkwood CD, Bishop RF, Coulson BS. Human rotavirus VP4 contains strain-specific, serotype-specific and cross-reactive neutralization sites. *Arch. Virol.* 1996;141:587–600.

Kirkwood CD, Boniface K, Bishop RF, Barnes GL. Australian Rotavirus Surveillance Program: annual report, 2009/2010. *Commun Dis Intell Q Rep.* 2010;34(4):427-34.

Komoto S, Maeno Y, Tomita M, Matsuoka T, Ohfu M, Yodoshi T, Akeda H, Taniguchi K. Whole genomic analysis of a porcine-like human G5P[6] rotavirus strain isolated from a child with diarrhoea and encephalopathy in Japan. *J Gen Virol.* 2013 Jul;94(Pt 7):1568-75.

Krishnan, T., Burke, B., Shen, S., Naik, T. N. & Desselberger, U. (1994). Molecular epidemiology of human rotaviruses in Manipur: genome analysis of rotaviruses of long electropherotype and subgroup I. *Arch Virol* 134, 279-292.

Kumar M, Jayaram H, Vasquez-Del Carpio R, Jiang X, Taraporewala ZF, Jacobson RH et al. Crystallographic and biochemical analysis of rotavirus NSP2 with nucleotides reveals a nucleoside diphosphate kinase-like activity. *J. Virol.*, 2007;81,12272–12284.

La Frazia S, Ciucci A, Arnoldi F, Coira M, Gianferretti P, Angelini M et al. Thiazolidines, a new class of antiviral agents effective against rotavirus infection, target viral morphogenesis, inhibiting viroplasm formation. *J Virol.* 2013 Oct;87(20):11096-106.

Lamberti LM, Fischer Walker CL, Noiman A, Victora C, Black RE. Breastfeeding and the risk for diarrhea morbidity and mortality. *BMC Public Health.* 2011;11(Suppl 3):S15.

László B1, Kónya J, Dandár E, Deák J, Farkas Á, Gray J, Grósz G, Iturriza-Gomara M, Jakab F, Juhász Á, Kisfali P, Kovács J, Lengyel G, Martella V, Melegh B, Mészáros J, Molnár P, Nyúl Z, Papp H, Pátri L, Puskás E, Sántha I, Schneider F, Szomor K, Tóth A, Tóth E, Szűcs G, Bányai K. Surveillance of human rotaviruses in 2007-2011,



Hungary: exploring the genetic relatedness between vaccine and field strains. *J Clin Virol.* 2012 Oct;55(2):140-6.

Lee JT, Lee CN, Shao PL, Chang LY, Lu CY, Lee PI, et al. Clinical characteristics of nosocomial rotavirus infection in children in Taiwan. *J Formos Med Assoc.* 2008;107(10):791e7.

Leite JP, Carvalho-Costa FA, Linhares AC. Group A rotavirus genotypes and the ongoing Brazilian experience: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2008;103,745-53.

Linhares, A. C., Pinheiro, F. P., Schmetz, C., Muller, G. & Peters, D. Duovirus (Rotavirus) in Belem, State of Para, Brazil (preliminary report). *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1977: 19, 278-279.

Linhares AC, Gabbay YB, Freitas RB, da Rosa ES, Mascarenhas JD, Loureiro EC. Longitudinal study of rotavirus infections among children from Belém, Brazil. *Epidemiol Infect.* 1989;102(1):129-45.

Linhares AC, Bresee JS. Rotavirus vaccines and vaccination in Latin America. *Rev Panam Salud Publica.* 2000;8(5):305-31.

Linhares AC, Stupka JA, Ciapponi A, Bardach AE, Glujovsky D, Aruj PK et al. Burden and typing of rotavirus group A in Latin America and the Caribbean: systematic review and meta-analysis. *Rev Med Virol.* 2011;83(3):377–557.

Linhares AC1, Justino MC. Rotavirus vaccination in Brazil: effectiveness and health impact seven years post-introduction. *Expert Rev Vaccines.* 2014 Jan;13(1):43-57.

López T, Rojas M, Ayala-Bretón C, López S, Arias CF. Reduced expression of the rotavirus NSP5 gene has a pleiotropic effect on virus replication. *J Gen Virol.* 2005;86(6):1609-17.

Lopez S, Arias CF. Early steps in rotavirus cell entry. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2006;309:39-66.

López S, Arias CF. Rotavirus-host cell interactions: an arms race. *Curr Opin Virol.* 2012;2(4):389-98.

Lourenco MH, Nicolas JC, Cohen J, Scherrer R, Bricout F. Study of human rotavirus genome by electrophoresis: attempt of classification among strains isolated in France. *Ann Virol Inst Pasteur*. 1981;132:161-73.

Lundgren O, Timar-Peregrin A, Persson K, Kordasti S, Uhnöo I, Svensson L. Role of the enteric nervous system in the fluid and electrolyte secretion of rotavirus diarrhea. *Science*. 2000;287:491–495.

Martella V, Potgieter AC, Lorusso E, De Grazia S, Giammanco GM, Matthijnssens J, Bányai K, Ciarlet M, Lavazza A, Decaro N, Buonavoglia C. A feline rotavirus G3P[9] carries traces of multiple reassortment events and resembles rare human G3P[9] rotaviruses. *J Gen Virol*. 2011; 92(Pt 5):1214-21.

Mascarenhas, J. D., Linhares, A. C., Gabbay, Y. B., de Freitas, R. B., Mendez, E., Lopez, S. & Arias, C. F. Naturally occurring serotype 2/subgroup II rotavirus reassortants in northern Brazil. *Virus Res* 1989;14, 235-240.

Mascarenhas JD, Linhares AC, Gabbay YB, Leite JP. Detection and characterization of rotavirus G and P types from children participating in a rotavirus vaccine trial in Belém, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002 Jan;97(1):113-7.

Matsuno S, Hasegawa A, Kalica AR, Kono R. Isolation of a recombinant between simian and bovine rotaviruses. *J Gen Virol*. 1980; 48: 253-6.

Matthijnssens J, Ciarlet M, Heiman E, Arijs I, Delbeke T, McDonald SM et al. Full genome-based classification of rotaviruses reveals a common origin between human Wa-Like and porcine rotavirus strains and human DS-1-like and bovine rotavirus strains. *J Virol*. 2008 Apr;82(7):3204-19.

Matthijnssens J, Heylen E, Zeller M, Rahman M, Lemey P, Van Ranst M. Phylodynamic analyses of rotavirus genotypes G9 and G12 underscore their potential for swift global spread. *Mol Biol Evol*. 2010;27(10):2431-6.

Matthijnssens J, Ciarlet M, McDonald SM, Attoui H, Bányai K, Brister JR, Buesa J, Esona MD, Estes MK, Gentsch JR, Iturriza-Gómara M, Johne R, Kirkwood CD, Martella V, Mertens PP, Nakagomi O, Parreño V, Rahman M, Ruggeri FM, Saif LJ, Santos N, Steyer A, Taniguchi K, Patton JT, Desselberger U, Van Ranst M. Uniformity

of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). *Arch Virol.* 2011;156(8):1397-413.

Matthijnssens J, Nakagomi O, Kirkwood CD, Ciarlet M, Desselberger U, Van Ranst M. Group A rotavirus universal mass vaccination: how and to what extent will selective pressure influence prevalence of rotavirus genotypes? *Expert Rev Vaccines.* 2012 Nov;11(11):1347-54.

Matthijnssens J, Van Ranst M. Genotype constellation and evolution of group A rotaviruses infecting humans. *Curr Opin Virol.* 2012 Aug;2(4):426-33.

McClain B, Settembre E, Temple BR, Bellamy AR, Harrison SC. X-ray crystal structure of the rotavirus inner capsid particle at 3.8 Å resolution. *J Mol Biol.* 2010; 26;397(2):587-99.

McDonald SM, Patton JT. Assortment and packaging of the segmented rotavirus genome. *Trends in Microbiology.* 2011;19(3):136-44.

Madhi SA, Cunliffe NA, Steele D, Witte D, Kirsten M, Louw C, et al: Effect of human rotavirus vaccine on severe diarrhea in African infants. *N Engl J Med* 2010, 362:289–298.

Ministério da Saúde (Brasil). Informe técnico doença diarreica por rotavírus: vigilância epidemiológica e prevenção pela vacina oral de rotavírus humano – VORH. Brasília, DF: Programa Nacional de Imunizações, Secretaria de Vigilância Epidemiológica, Ministério da Saúde; 2006.

Mladenova Z, Papp H, Lengyel G, Kisfali P, Steyer A, Steyer AF, Esona MD, Iturriza-Gómara M, Bányai K. Detection of rare reassortant G5P[6] rotavirus, Bulgaria. *Infect Genet Evol.* 2012 Dec;12(8):1676-84.

Molyneaux PJ. Human immunity to rotavirus. *J Med Microbiol.* 1995;43(6):397-404.

Montero H, Arias CF, Lopez S. Rotavirus nonstructural protein NSP3 is not required for viral protein synthesis. *J. Virol.*, 2006;80,9031–9038.

Mossel EC, Ramig RF. Rotavirus genome segment 7 (NSP3) is a determinant of extraintestinal spread in the neonatal mouse. *J. Virol.* 2002;76,6502–6509.

Mossel EC, Ramig RF. A lymphatic mechanism of rotavirus extraintestinal spread in the neonatal mouse. *J. Virol.* 2003;77:12352–12356.

Mukherjee A, Mullick S, Deb AK, Panda S, Chawla-Sarkar M. First report of human rotavirus G8P[4] gastroenteritis in India: evidence of ruminants-to-human zoonotic transmission. *J Med Virol.* 2013 Mar;85(3):537-45.

Munford V, Gilio AE, de Souza EC, Cardoso DM, Cardoso Dd, Borges AM, Costa PS, Melgaço IA, Rosa H, Carvalho PR, Goldani MZ, Moreira ED Jr, Santana C, El Khoury A, Ikedo F, Rácz ML. Rotavirus gastroenteritis in children in 4 regions in Brazil: a hospital-based surveillance study. *J Infect Dis.* 2009 Nov 1;200 Suppl 1:S106-13.

Musalem C, Espejo RT. Release of progeny virus from cells infected with simian rotavirus SA11. *J Gen Virol.* 1985; 66 ( Pt 12):2715-24.

Nakagomi O, Nakagomi T, Akatani K, Ikegami N. Identification of rotavirus genogroups by RNA-RNA hybridization. *Mol Cell Probes.* 1989;3(3):251-61.

Nakagomi, O., and Nakagomi, T. Genetic diversity and similarity among mammalian rotaviruses in relation to interspecies transmission of rotavirus. *Arch Virol* 1991; 120(1-2), 43-55.

Nakagomi T, Cuevas LE, Gurgel RG, Elrokhsi SH, Belkhir YA, Abugalia M et al. Apparent extinction of non-G2 rotavirus strains from circulation in Recife, Brazil, after the introduction of rotavirus vaccine. *Arch Virol.* 2008;153(3):591-3.

Offit PA, Shaw RD, Greenberg HB. Passive protection against rotavirus-induced diarrhea by monoclonal antibodies to surface proteins VP3 and VP7. *J Virol.* 1986;58(2):700-3.

Offit PA. Host factors associated with protection against rotavirus disease: the skies are clearing. *J Infect Dis.* 1996;174 Suppl 1:S59-64.

Oh HK, Hong SH, Ahn BY, Min HK. Phylogenetic Analysis of the Rotavirus Genotypes Originated from Children < 5 Years of Age in 16 Cities in South Korea, between 2000 and 2004. *Osong Public Health Res Perspect.* 2012 Mar;3(1):36-42.

- O'Ryan ML, Matson DO, Estes MK, Pickering LK. Anti-rotavirus G type-specific and isotype-specific antibodies in children with natural rotavirus infections. *J Infect Dis.* 1994;169(3):504-11.
- O'Ryan M, Lucero Y, Linhares AC. Rotarix®: vaccine performance 6 years postlicensure. *Expert Rev Vaccines.* 2011; 10 (12): 1645-1659.
- Padilla-Noriega M, Paniagua O, Guzman-Leon S. Rotavirus protein NSP3 shuts off host cell protein synthesis. *Virology.* 2002;298,1-7.
- Palombo, E. A. & Bishop, R. F. Genetic and antigenic characterization of a serotype G6 human rotavirus isolated in Melbourne, Australia. *J Med Virol* 1995: 47, 348-354.
- Pando V, Isa P, Arias CF, López S. Influence of calcium on the early steps of rotavirus infection. *Virology.* 2002;295(1):190-200.
- Parashar UD, Gibson CJ, Bresse JS, Glass RI. Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerg Infect Dis* 2006;12:304-6.
- Parra GI. Seasonal shifts of group A rotavirus strains as a possible mechanism of persistence in the human population. *J Med Virol.* 2009 Mar;81(3):568-71.
- Parreño V, Béjar C, Vagnozzi A, Barrandeguy M, Costantini V, Craig MI, Yuan L, Hodgins D, Saif L, Fernández F. Modulation by colostrum-acquired maternal antibodies of systemic and mucosal antibody responses to rotavirus in calves experimentally challenged with bovine rotavirus. *Vet Immunol Immunopathol.* 2004;100(1-2):7-24.
- Patel MM, de Oliveira LH, Bispo AM, Gentsch J, Parashar UD. Rotavirus P[4]G2 in a vaccinated population, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2008 May;14(5):863-5.
- Patel MM, Steele D, Gentsch JR, Wecker J, Glass RI, Parashar UD. Real-world impact of rotavirus vaccination. *Pediatr Infect Dis J.* 2011;30(1 Suppl):S1-5.
- Patton JT. Structure and function of the rotavirus RNA-binding proteins. *J Gen Virol.* 1995;76 ( Pt 11):2633-44.
- Patton JT, Chnaiderman J, Spencer E. Open reading frame in rotavirus mRNA specifically promotes synthesis of double-stranded RNA: template size also affects replication efficiency. *Virology.* 1999;264(1):167-80.

Patton JT. Rotavirus diversity and evolution in the post-vaccine world. *Discov Med*. 2012;13(68):85-97.

Payne DC, Edwards KM, Bowen MD, Keckley E, Peters J, Esona MD, Teel EN, Kent D, Parashar UD, Gentsch JR. Sibling transmission of vaccine-derived rotavirus (RotaTeq) associated with rotavirus gastroenteritis. *Pediatrics*. 2010 Feb;125(2):e438-41.

Payne DC, Staat MA, Edwards KM, Szilagyi PG, Weinberg GA, Hall CB, Chappell J, Curns AT, Wikswo M, Tate JE, Lopman BA, Parashar UD; New Vaccine Surveillance Network (NVSN). Direct and indirect effects of rotavirus vaccination upon childhood hospitalizations in 3 US Counties, 2006-2009. *Clin Infect Dis*. 2011;53(3):245-53.

Pedley, S., Hundley, F., Chrystie, I., McCrae, M. A. & Desselberger, U. The genomes of rotaviruses isolated from chronically infected immunodeficient children. *J Gen Virol* 1984: 65 ( Pt 7), 1141-1150.

Phan, T. G., Okitsu, S., Maneekarn, N. & Ushijima, H. Genetic heterogeneity, evolution and recombination in emerging G9 rotaviruses. *Infect Genet Evol* 2007b: 7, 656-663.

Pietruchinski E, Benati F, Lauretti F, Kisielius J, Ueda M, Volotão EM et al. Rotavirus diarrhea in children and adults in a southern city of Brazil in 2003: distribution of G/P types and finding of a rare G12 strain. *J Med Virol*. 2006;78(9):1241-9.

Piron M, Delaunay T, Grosclaude J, Poncet D. Identification of the RNA-binding, dimerization, and eIF4GI-binding domains of rotavirus nonstructural protein NSP3. *J. Virol.*, 1999;73,5411–5421.

Pursem VN, Peeroo BM, Mangar TI, Sohawon FM, Seheri LM, Mphahlele MJ, Mwenda JM, Manraj SS. Epidemiology of rotavirus diarrhea and diversity of rotavirus strains among children less than 5 years of age with acute gastroenteritis in Mauritius: June 2008 to December 2010. *Pediatr Infect Dis J*. 2014 Jan;33 Suppl 1:S49-53.

Rahman M, Matthijnsens J, Goegebuer T, De Leener K, Vanderwegen L, van der Donck I et al. Predominance of rotavirus G9 genotype in children hospitalized for rotavirus gastroenteritis in Belgium during 1999-2003. *J Clin Virol*. 2005 May;33(1):1-6.

Ramig RF. Pathogenesis of intestinal and systemic rotavirus infection. *J Virol.* 2004;78(19):10213-20.

Rehwinkel J, Reis e Sousa C. RIGorous detection: exposing virus through RNA sensing. *Science.* 2010;327(5963):284-6.

Richardson SC, Bishop RF. Homotypic serum antibody responses to rotavirus proteins following primary infection of young children with serotype 1 rotavirus. *J Clin Microbiol.* 1990;28(9):1891-7.

Rivera L, Peña LM, Stainier I, Gillard P, Chevart B, Smolenov I et al. Horizontal transmission of a human rotavirus vaccine strain: a randomized, placebo-controlled study in twins. *Vaccine.* 2011; 29 (51): 9508-9513.

Rose TL, Marques da Silva MF, Gómez MM, Resque HR, Ichihara MY, Volotão E de M, Leite JP. Evidence of Vaccine-related Reassortment of Rotavirus, Brazil, 2008–2010. *Emerg Infect Dis.* 2013 Nov;19(11):1843-6.

Rossignol JF, El-Gohary YM. Nitazoxanide in the treatment of viral gastroenteritis: a randomized double-blind placebo-controlled clinical trial. *Aliment Pharmacol Ther.* 2006;24(10):1423-30.

Rojas M, Arias CF, López S. Protein kinase R is responsible for the phosphorylation of eIF2 $\alpha$  in rotavirus infection. *J Virol.* 2010;84(20):10457-66.

Ruiz MC, Leon T, Diaz Y, Michelangeli F. Molecular biology of rotavirus entry and replication. *ScientificWorldJournal.* 2009;9:1476-97.

Ruiz-Palacios GM, Perez-Schael I, Velazquez FR, Abate H, Breuer T, Clemens SC, Chevart B, Espinoza F, Gillard P, Innis BL, Cervantes Y, Linhares AC, Lopez P, Macias-Parra M, Ortega-Barria E, Richardson V, Rivera-Medina DM, Rivera L, Salinas B, Pavia-Ruz N, et al. Safety and efficacy of an attenuated vaccine against severe rotavirus gastroenteritis. *N Engl J Med.* 2006;354(1):11-22.

Saif LJ, Fernandez FM. Group A rotavirus veterinary vaccines. *J Infect Dis.* 1996;174 Suppl 1:S98-106.

Sánchez-Fauquier A1, Montero V, Colomina J, González-Galán V, Aznar J, Aisa ML, Gutierrez C, Sainz de Baranda C, Wilhelmi I. Global study of viral diarrhea in hospitalized children in Spain: results of structural surveillance of viral gastroenteritis net work (VIGESS-net) 2006-2008. *J Clin Virol.* 2011 Dec;52(4):353-8.

Santos N, Soares CC, Volotão EM, Albuquerque MC and Hoshino Y. Surveillance of Rotavirus Strains in Rio de Janeiro, Brazil, from 1997 to 1999. *J Clin Virol.* 2003, p. 3399–3402.

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

Santos N, Volotão EM, Soares CC, Campos GS, Sardi SI, Hoshino Y. Predominance of rotavirus genotype G9 during the 1999, 2000, and 2002 seasons among hospitalized children in the city of Salvador, Bahia, Brazil: implications for future vaccine strategies. *J Clin Microbiol.* 2005 Aug;43(8):4064-9.

Schnepf N, Deback C, Dehee A, Gault E, Perez N, Garbarg-Chenon A. Rearrangements of rotavirus genomic segment 11 are generated during acute infection of immunocompetent children and do not occur at random. *J Virol.* 2008 Apr;82(7):3689-96.

Secretaria de Vigilância em Saúde/ Ministério da Saúde. Fonte: <http://portal.saude.gov.br> Acesso em 02/04/2014 às 10:00h.

Shen Z, He H, Wu Y, Li J. Cyclosporin a inhibits rotavirus replication and restores interferon-beta signaling pathway in vitro and in vivo. *PLoS One.* 2013 Aug 21;8(8):e71815.

Silva, M.F.M., Tort, L.F., Gómez, M.M., Assis, R.M., Volotão, E.M., de Mendonça, M.C.L., Bello, G., Leite, J.P. VP7 Gene of human rotavirus A genotype G5: Phylogenetic analysis reveals the existence of three different lineages worldwide. *J Med Virol.* 2011: Vol. 83(2), 357-66.

Silva, M.F.M., Tort, L.F., Gómez, M.M., Assis, R.M., de Mendonça, M.C.L., Volotão, E.M., Leite, J.P. Phylogenetic analysis of VP1, VP2, and VP3 gene segments of



genotype G5 group A rotavirus strains circulating in Brazil between 1986 and 2005. *Virus Res.* 2011 Sep;160(1-2):381-8.

Silva MF, Gómez MM, Rose TL, Volotão Ede M, Carvalho-Costa FA, Bello G, Leite JP. VP8\*P[8] lineages of group A rotaviruses circulating over 20 years in Brazil: proposal of six different sub-lineages for P[8]-3 clade. *Infect Genet Evol.* 2013 Jun;16:200-5.

Siqueira AA, Santelli AC, Alencar LR Jr, Dantas MP, Dimech CP, Carmo GM 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.* 2010 Oct;14(10):e898-903.

Snodgrass DR, Wells PW. Rotavirus infection in lambs: studies on passive protection. *Arch Virol.* 1976;52(3):201-5.

Snodgrass DR, Browning G. Enteric vaccines for farm animals and horses. In: Peters AR (ed) *Vaccines for veterinary applications.* Oxford, Butterworth-Heinemann. 1993. p. 73-95.

Soares LD, Lobo PD, Mascarenhas JD, Neri DL, Guerra SD, De Oliveira AD 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.* 2011 Jan;157(1):135-9.

Staat MA, Azimi PH, Berke T, Roberts N, Bernstein DI, Ward RL, Pickering LK, Matson DO. Clinical presentations of rotavirus infection among hospitalized children. *Pediatr Infect Dis J.* 2002 Mar;21(3):221-7.

Stupka JA, Carvalho P, Amarilla AA, Massana M, Parra GI. National Rotavirus Surveillance in Argentina: high incidence of G9P[8] strains and detection of G4P[6] strains with porcine characteristics. *Infect Genet Evol.* 2009;9:1225–31.

Stupka JA, Degiuseppe JI, Parra GI. Increased frequency of rotavirus G3P[8] and G12P[8] in Argentina during 2008-2009: whole-genome characterization of emerging G12P[8] strains. 2012. *J Clin Virol.* Jun;54(2):162-7

Subodh S, Bhan MK, Ray P. Genetic characterization of VP3 gene of group A rotaviruses. *Virus Genes.* 2006;33(2),143-5.

Svensson L, Sheshberadaran H, Vene S, Norrby E, Grandien M, Wadell G. Serum antibody responses to individual viral polypeptides in human rotavirus infections. *J Gen Virol.* 1987; 68:643–651.

Tafazoli F, Zeng CQ, Estes MK, Magnusson KE, Svensson L. NSP4 enterotoxin of rotavirus induces paracellular leakage in polarized epithelial cells. *J. Virol.* 2001;75:1540–1546.

Taniguchi, K., Urasawa, T., and Urasawa, S. Species specificity and interspecies relatedness in VP4 genotypes demonstrated by VP4 sequence analysis of equine, feline, and canine rotavirus strains. *Virology* 1994: 200(2), 390-400.

Taniguchi, K. & Urasawa, S. Diversity in rotavirus genomes. *Seminars in Virology* 1995: 6, 123 - 131.

Taraporewala, Z, Chen D, Patton JT. Multimers formed by the rotavirus nonstructural protein NSP2 bind to RNA and have nucleoside triphosphatase activity. *J. Virol.* 1999; 73: 9934-43.

Taraporewala ZF, Patton JT. Identification and characterization of the helix-destabilizing activity of rotavirus nonstructural protein NSP2. *J. Virol.* 2001;75,4519–4527.

Taraporewala ZF, Patton JT. Nonstructural proteins involved in genome packaging and replication of rotaviruses and other members of the Reoviridae. *Virus Res.* 2004; 101: 57-66.

Tate JE, Patel MM, Steele AD, Gentsch JR, Payne DC, Cortese MM et al. Global impact of rotavirus vaccines. *Expert Rev Vaccines.* 2010 Apr;9(4):395-407.

Teran CG, Teran-Escalera CN, Villarroel P. Nitazoxanide vs. probiotics for the treatment of acute rotavirus diarrhea in children: a randomized, single-blind, controlled trial in Bolivian children. *Int J Infect Dis.* 2009 Jul;13(4):518-23.

Tort LF, Volotão Ede M, de Mendonça MC, da Silva MF, Siqueira AA, Assis RM et al. Phylogenetic analysis of human P[8]G9 rotavirus strains circulating in Brazil reveals the presence of a novel genetic variant. *J Clin Virol.* 2010;47(4):345-55.

Trask SD, McDonald SM, Patton JT. Structural insights into the coupling of virion assembly and rotavirus replication. *Nat Rev Microbiol.* 2012 Jan 23;10(3):165-77.

Tsugawa, T. & Hoshino, Y. Whole genome sequence and phylogenetic analyses reveal human rotavirus G3P[3] strains Ro1845 and HCR3A are examples of direct virion transmission of canine/feline rotaviruses to humans. *Virology* 2008: 380, 344-353.

Urbina D, Rodríguez JG, Arzuza O, Parra E, Young G, Castro R, del-Portillo P. G and P genotypes of rotavirus circulating among children with diarrhea in the Colombian northern coast. *Int Microbiol.* 2004;7(2):113-20.

Van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, Cartens EB, Estes MK, Lemon SM, Maniloff J, Mayo MA, McGeoch DJ, Pringle CR, Wickner RB. Ball, LA. The universal taxonomy of viruses in theory and practice. In: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA, editors. *Virus Taxonomy: Eight Report of the International Committee on taxonomy of Viruses.* Elsevier, Academic Press; Amsterdam, Holland: 2005. p. 3-8.

Varani G, Allain FH. How a rotavirus hijacks the human protein synthesis machinery. *Nature Struct. Biol.* 2002;9,158–160.

Velázquez FR, Matson DO, Calva JJ, Guerrero L, Morrow AL, Carter-Campbell S, Glass RI, Estes MK, Pickering LK, Ruiz-Palacios GM. Rotavirus infections in infants as protection against subsequent infections. *N Engl J Med.* 1996;335(14):1022-8.

Venkataram BV, Crawford S, Lawton JA, Pesavento J, Hardy M, Estes MK. Structural studies on gastroenteritis viruses. In: *Gastroenteritis viruses*, edited by D, Chadwick and J A Goode, Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 2001. p. 26-46.

Vesikari T, Clark HF, Offit PA, Dallas MJ, DiStefano DJ, Goveia MG et al. Effects of the potency and composition of the multivalent human-bovine (WC3) reassortant rotavirus vaccine on efficacy, safety and immunogenicity in healthy infants. *Vaccine.* 2006;24(22),4821-9.

Walker C.L., Rudan I., Liu L., Nair H., Theodoratou E., Bhutta Z., O'Brien K.L, Campbell H. Global burden of childhood pneumonia and diarrhea. *Lancet* 2013; 381: 1405–16.

Ward RL, Kapikian AZ, Goldberg KM, Knowlton DR, Watson MW, Rappaport R. Serum rotavirus neutralizing-antibody titers compared by plaque reduction and enzyme-linked immunosorbent assay-based neutralization assays. *J Clin Microbiol.* 1996;34(4):983-5.

Ward RL, Kirkwood CD, Sander DS, Smith VE, Shao M, Bean JA, Sack DA, Bernstein DI. Reductions in cross-neutralizing antibody responses in infants after attenuation of the human rotavirus vaccine candidate 89-12. *J Infect Dis.* 2006;194(12):1729-36.

Ward RL, McNeal MM, Steele AD. Why does the world need another rotavirus vaccine? *Ther Clin Risk Manag.* 2008;4(1):49-63.

Wilhelmi I, Roman E, Sánchez-Fauquier A. Viruses causing gastroenteritis. *Clin Microbiol Infect.* 2003 Apr;9(4):247-62.

Wilkins C, Gale M Jr. Recognition of viruses by cytoplasmic sensors. *Curr Opin Immunol.* 2010 Feb;22(1):41-7.

World Health Organization, WHO. Weekly epidemiological record, N<sup>o</sup> 23, 5 June 2009. Url: <http://www.who.int/wer/2009/wer8423.pdf>. Acesso em 10/11/2013 às 22:00hs.

WHO/UNICEF. Global Immunization data. July 2013. Url: [http://www.who.int/hpvcentre/Global\\_Immunization\\_Data.pdf](http://www.who.int/hpvcentre/Global_Immunization_Data.pdf). Acesso em 03/01/2014 às 21:00h.

Widdowson MA, Bresee JS, Gentsch JR, Glass RI. Rotavirus disease and its prevention. *Curr Opin Gastroenterol.* 2005 Jan;21(1):26-31.

Worobey M, Holmes EC. Evolutionary aspects of recombination in RNA viruses. *J Gen Virol.* 1999; 80 ( Pt 10):2535-43.

Wu FT, Bányai K, Huang JC, Wu HS, Chang FY, Yang JY, Hsiung CA, Huang YC, Lin JS, Hwang KP, Jiang B, Gentsch JR. Diverse origin of P[19] rotaviruses in children with acute diarrhea in Taiwan: Detection of novel lineages of the G3, G5, and G9 VP7 genes. *J Med Virol.* 2011 Jul;83(7):1279-87.

Yen C, Tate JE, Patel MN, Cortese MM, Lopman B, Fleming J et al. Rotavirus vaccines: Update on global impact and future priorities. *Human Vaccines*. 2011; 12: 1282-1290.

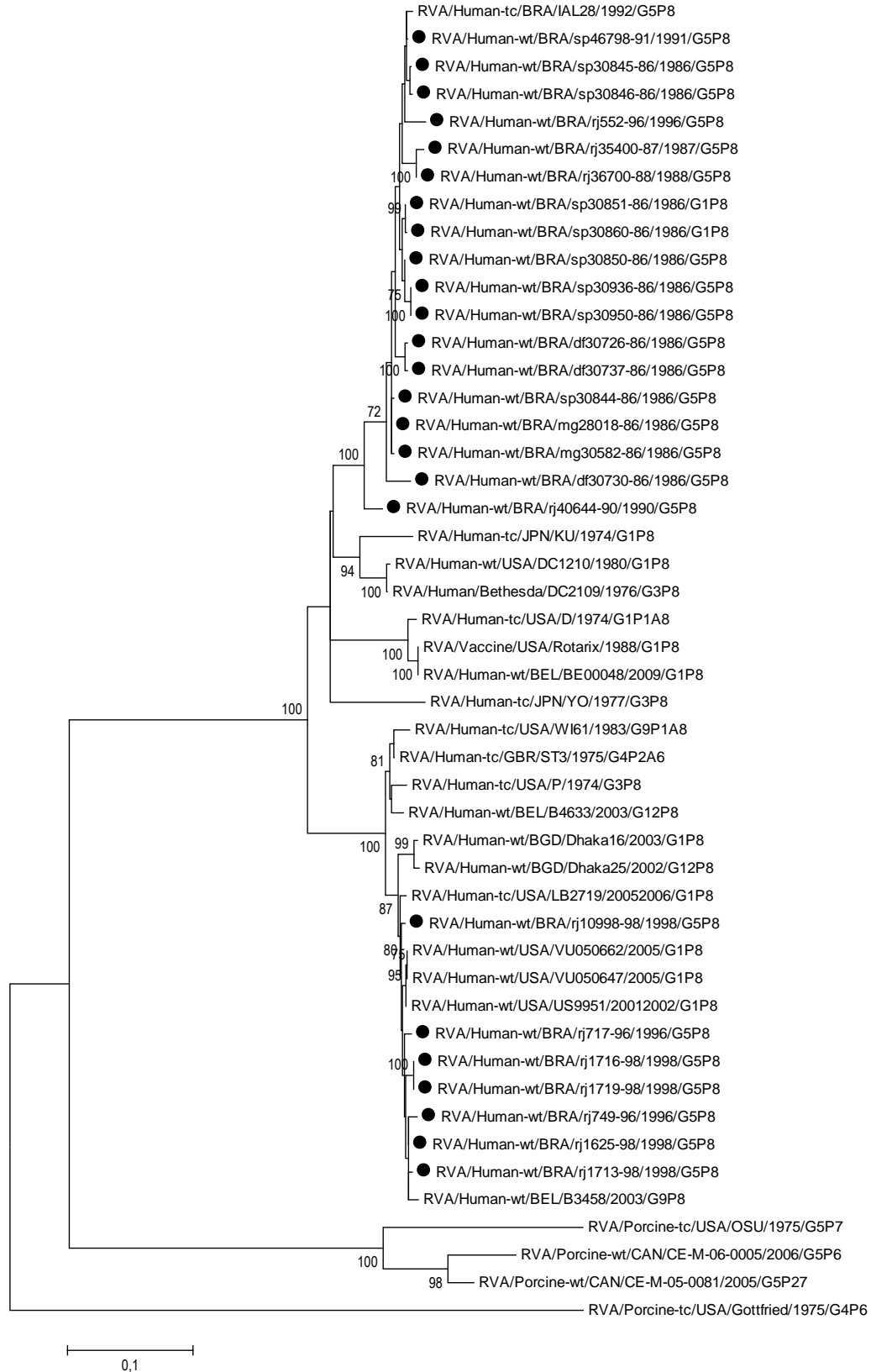
Zárate S, Cuadras MA, Espinosa R, Romero P, Juárez KO, Camacho-Nuez M et al. Interaction of rotaviruses with Hsc70 during cell entry is mediated by VP5. *J Virol*. 2003; 77(13):7254-60.

Zhang M, Zeng CQ, Morris AP, Estes MK. A functional NSP4 enterotoxin peptide secreted from rotavirus-infected cells. *J. Virol*. 2000;74:11663–11670.

**APÊNDICE:** Análises dos genes que codificam para as proteínas VP6, NSP1, NSP2, NSP3, NSP4 e NSP5 cepas brasileiras de genótipo G5P[8]

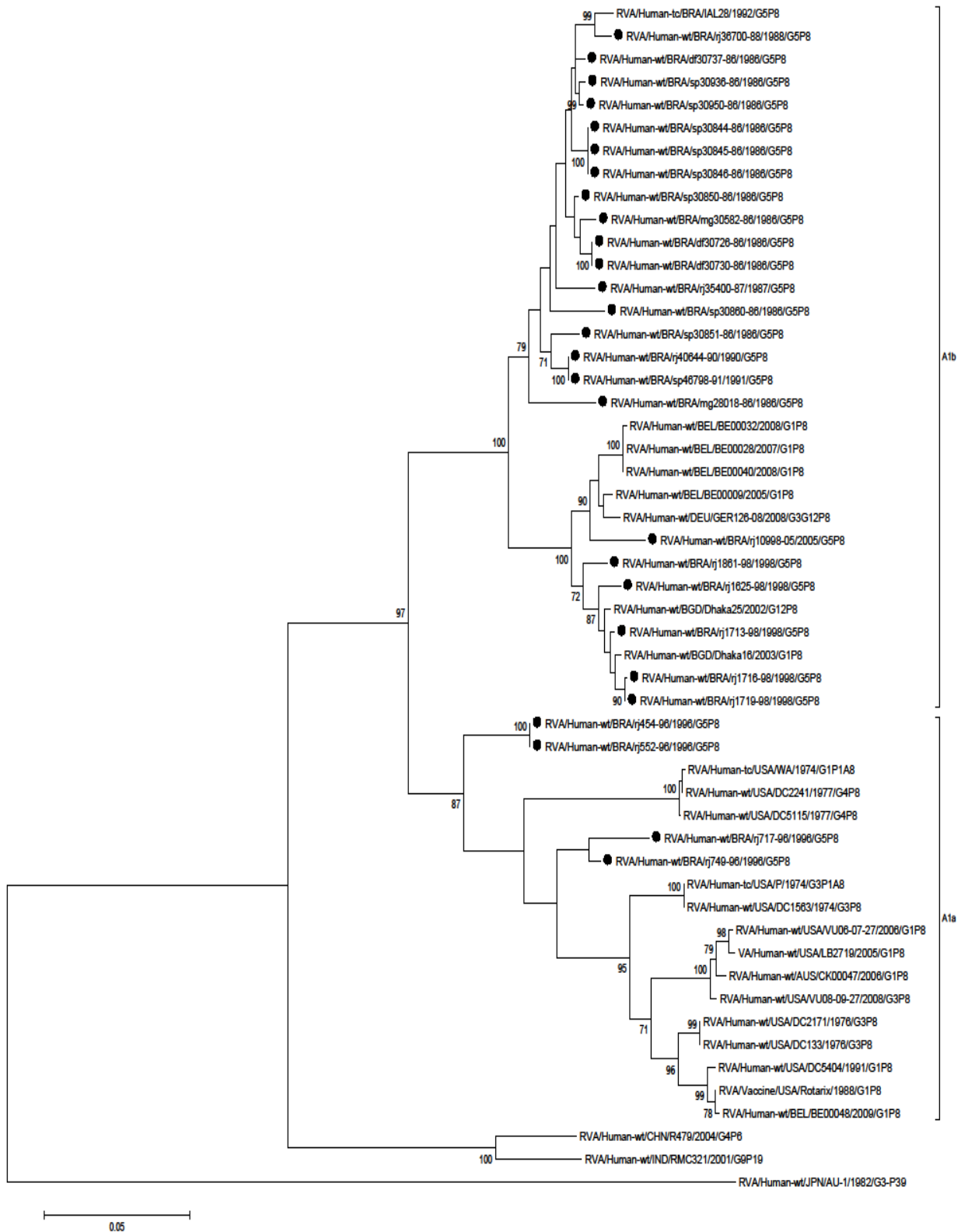
Strains	Genomic Constellation										
	VP7	VP4	VP6	VP1	VP2	VP3	NSP1	NSP2	NSP3	NSP4	NSP5
mg28018-86	G5	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
mg30582-86	G5	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
df30726-86	G5	P[8]	I1	R1	C1	M1	E1	N1	T1	E1	H1
df30730-86	G5	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
df30737-86	G5	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
sp30844-86	G5	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
sp30845-86	G5	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
sp30846-86	G5	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
sp30850-86	G5	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
sp30851-86	G5	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
sp30860-86	G5	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
sp30936-86	G5	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
sp30950-86	G5	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
rj35400-87	G5	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
rj36700-88	G5	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
rj40644-90	G5	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
sp46798-91	G5	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
sp46855-92	G5	P[8]	I1	R1	C1	M1	-	N1	T1	-	H1
rj454-96	G5	P[8]	-	R1	C1	M1	A1	N1	T1	-	H1
rj552-96	G5	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
rj717-96	G5	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
rj749-96	G5	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
rj1625-98	G5	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
rj1713-98	G5	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
rj1716-98	G5	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
rj1719-98	G5	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
rj1861-98	G5	P[8]	-	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
rj10998-05	G5	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1

Genomic constellation of Brazilian rotavirus A G5P[8] strains, according to the recommendations of the Rotavirus Classification Working Group. *Wa-like* genotypes are shown in green. – represents the absence of data.

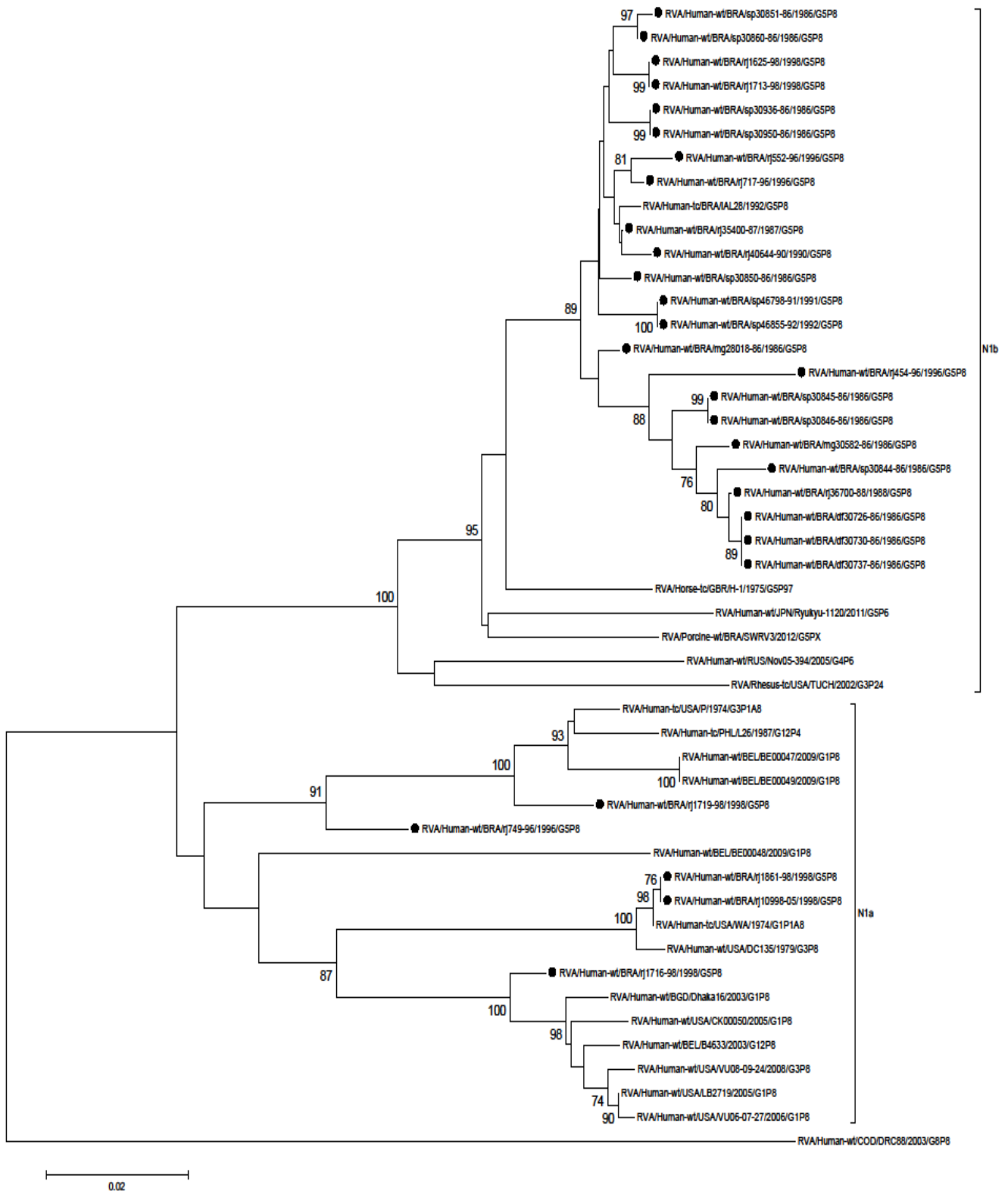


**Phylogenetic analysis based on the VP6 gene nucleotide sequences of Brazilian RVA G5 strains and sequences from the GenBank database.** Numbers at the nodes indicate bootstrap values; only values above 70% are shown. The scale bar at the bottom represents the number of substitutions per nucleotide position (nt.subst./site). Brazilian G5 strains are marked with a filled circle.

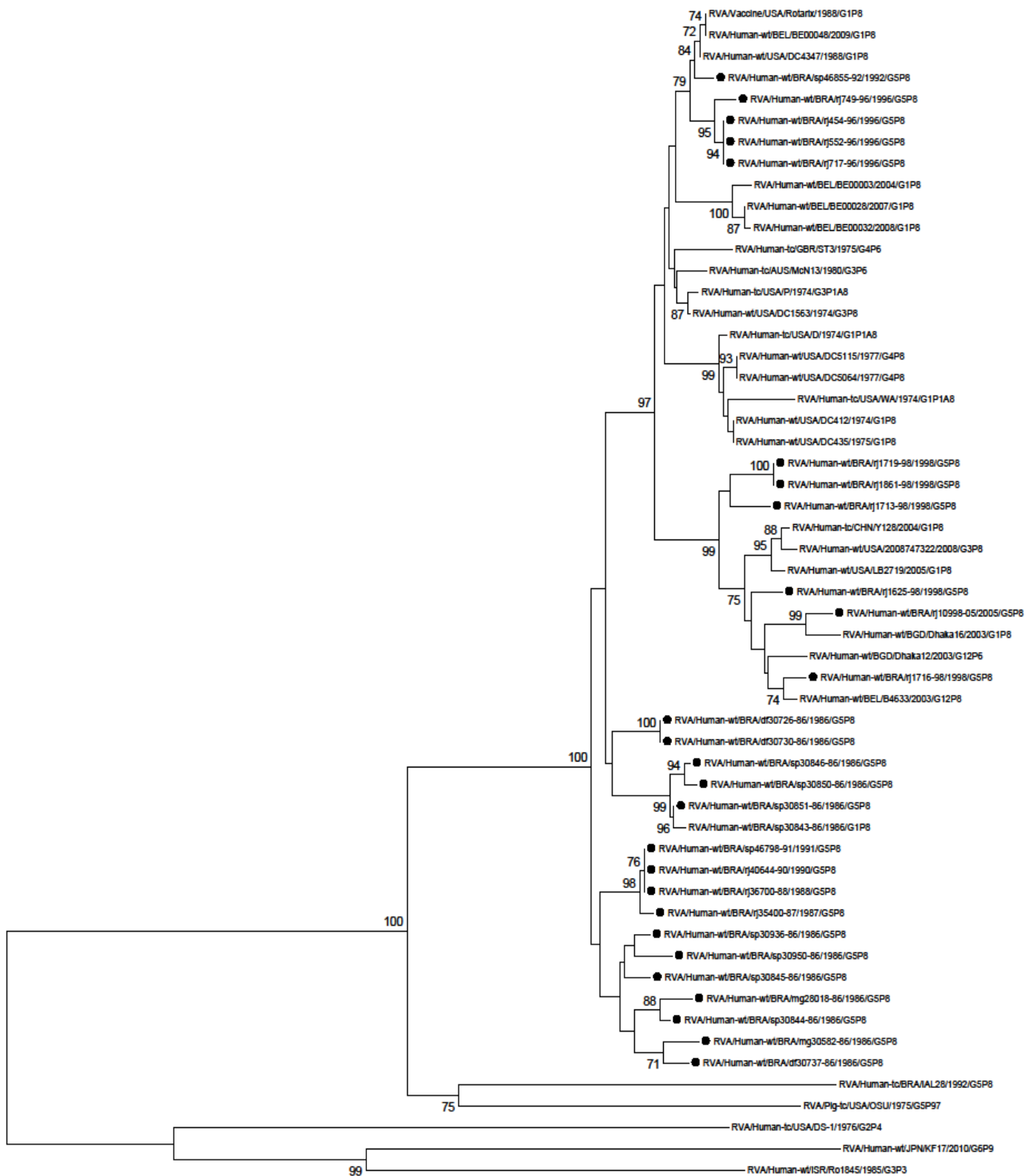




**Phylogenetic analysis based on the NSP1 gene nucleotide sequences of Brazilian RVA G5 strains and sequences from the GenBank database.** Numbers at the nodes indicate bootstrap values; only values above 70% are shown. The scale bar at the bottom represents the number of substitutions per nucleotide position (nt.subst./site). Brazilian G5 strains are marked with a filled circle.

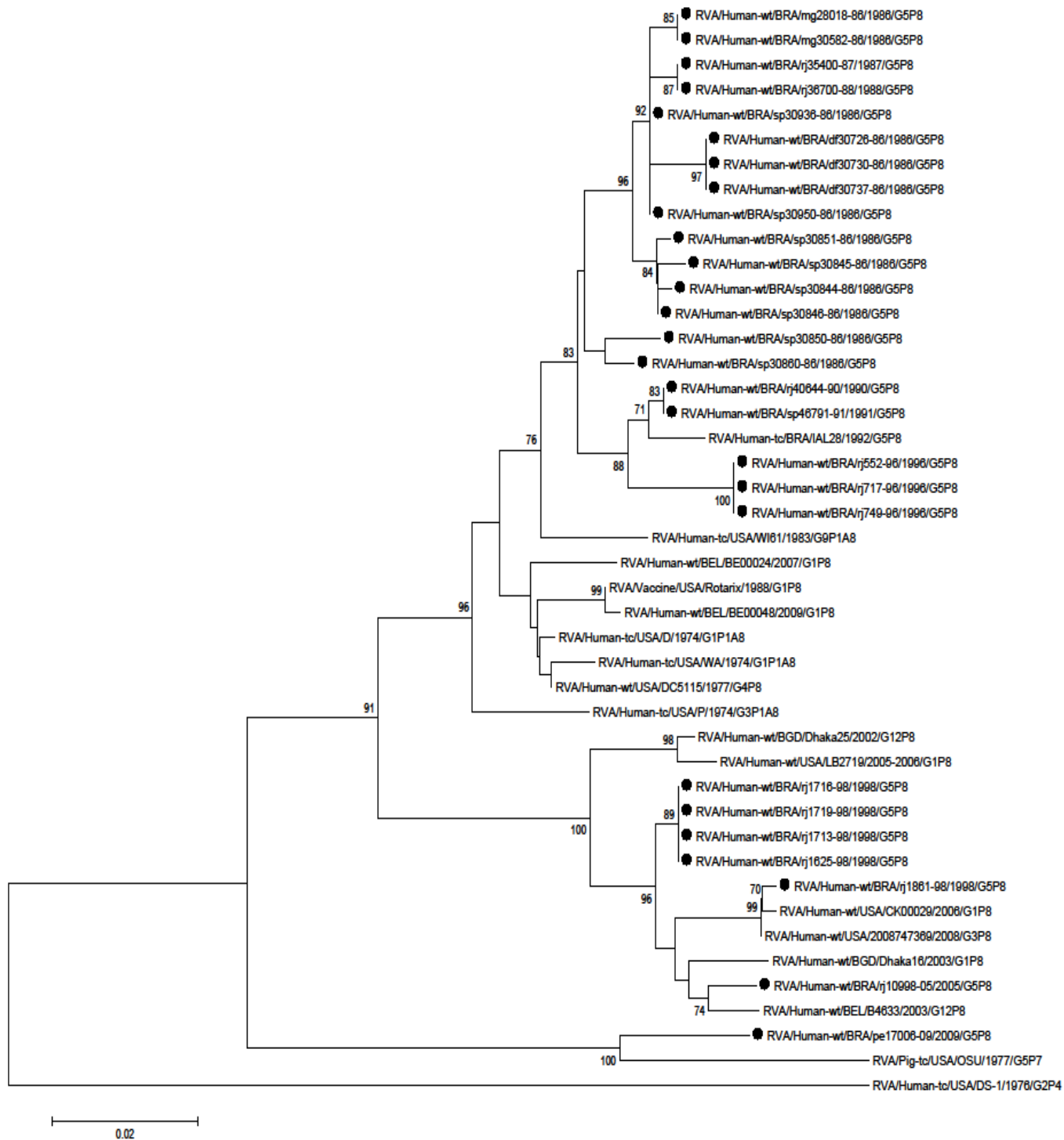


**Phylogenetic analysis based on the NSP2 gene nucleotide sequences of Brazilian RVA G5 strains and sequences from the GenBank database.** Numbers at the nodes indicate bootstrap values; only values above 70% are shown. The scale bar at the bottom represents the number of substitutions per nucleotide position (nt.subst./site). Brazilian G5 strains are marked with a filled circle.

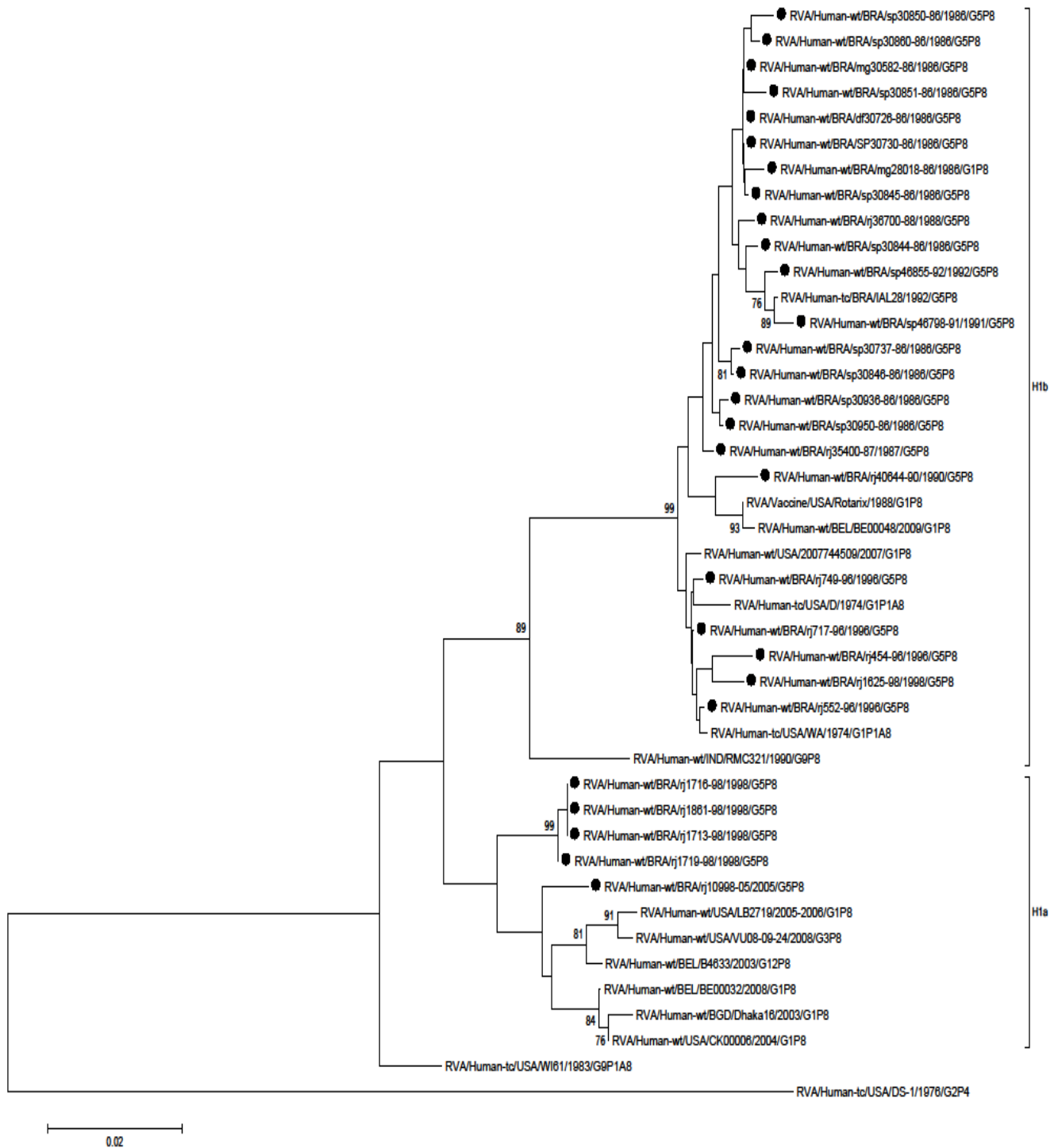


0.02

**Phylogenetic analysis based on the NSP3 gene nucleotide sequences of Brazilian RVA G5 strains and sequences from the GenBank database.** Numbers at the nodes indicate bootstrap values; only values above 70% are shown. The scale bar at the bottom represents the number of substitutions per nucleotide position (nt.subst./site). Brazilian G5 strains are marked with a filled circle.



**Phylogenetic analysis based on the NSP4 gene nucleotide sequences of Brazilian RVA G5 strains and sequences from the GenBank database.** Numbers at the nodes indicate bootstrap values; only values above 70% are shown. The scale bar at the bottom represents the number of substitutions per nucleotide position (nt.subst./site). Brazilian G5 strains are marked with a filled circle.



**Phylogenetic analysis based on the NSP5 gene nucleotide sequences of Brazilian RVA G5 strains and sequences from the GenBank database.** Numbers at the nodes indicate bootstrap values; only values above 70% are shown. The scale bar at the bottom represents the number of substitutions per nucleotide position (nt.subst./site). Brazilian G5 strains are marked with a filled circle.