

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Biologia Celular e Molecular

CARACTERIZAÇÃO DOS GENES VP4, VP6, VP7 E NSP4 DE ROTAVÍRUS A EM
CASOS DE GASTROENTERITE AGUDA EM CRIANÇAS HOSPITALIZADAS NO RIO
DE JANEIRO, 1986-2004.

IRENE TRIGUEIROS ARAUJO

Rio de Janeiro
2006

Trigueiros Araujo, Irene.

Caracterização dos genes VP4, VP6,VP7 e NSP4 de Rotavírus A em casos de gastroenterite aguda em crianças hospitalizadas no Rio de Janeiro, 1986-2004. / Irene Trigueiros Araujo. - Rio de janeiro, 2006.
60 f.; il.

Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2006.

Orientador: José Paulo Gagliardi Leite.

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

1. rotavírus. 2. gastroenterite. 3. genotipos. 4. sequenciamento. 5. análise filogenética. I. Título.

RESUMO

A primeira associação dos vírus como agentes etiológicos da gastroenterite foi feita em 1972 por Kapikian e colaboradores que, pela microscopia eletrônica, identificaram o vírus Norwalk e estabeleceram sua associação com a gastroenterite em jovens e adultos. Estudos posteriores revelaram a grande importância dos vírus na etiologia da diarreia, destacando-se entre eles, os Rotavírus humanos (RV). Os RV são transmitidos principalmente via fecal-oral e atualmente representam um dos mais importantes agentes etiológicos da gastroenterite infantil aguda. A classificação dos RV é feita com base em estudos moleculares dos genes VP4 e VP7, que caracterizam os genótipos P e G, respectivamente. É utilizada a reação em cadeia pela polimerase precedida de transcrição reversa (RT-PCR) e reações de semi-nested PCR ou ainda o seqüenciamento de amplicons consensuais obtidos das regiões dos genes VP4 e VP7. Os genótipos P[8]G1, P[4]G2, P[8]G3 e P[8]G4 representam os mais comuns na maior parte do mundo, entretanto genes que codificam outras proteínas também estão sendo estudados a fim de se ampliar o conhecimento do papel de cada um destes no processo de infecção e estabelecimento da doença. A proteína estrutural VP6 é a responsável pela definição de grupo e especificidade de subgrupo, sendo os RV do grupo A epidemiologicamente os mais importantes e os principais responsáveis pelos episódios de diarreia infantil aguda em todo mundo. A proteína não-estrutural NSP4 é uma glicoproteína que tem participação no processo de maturação dos RV e já foi proposta como enterotoxina viral. Essas características fazem das proteínas VP6 e NSP4 alvo de nosso estudo de seqüenciamento e análise filogenética, juntamente com as proteínas VP4 e VP7. Os dados a serem obtidos no estudo individual dessas proteínas podem esclarecer o perfil de infecção e gravidade da doença, trazendo informações úteis para o monitoramento de vacinas anti-RV.

ABSTRACT

Group A Rotaviruses represent the main cause of acute gastroenteritis in children under five years old worldwide. Epidemiological surveys and molecular analysis of strains are required for gastroenteritis control and prevention. Thirty human rotavirus strains isolated in Rio de Janeiro from 1986-2004 comprising genotypes P8G1, P8G5, P8G9 and P4G2 were sequenced and analyzed for VP4, VP6, VP7 and NSP4 genes. Two distinct genetic groups could be recognized for the NSP4 gene, with G2 and non-G2 strains correlated to genotypes NSP4A-KUN and NSP4B-Wa, respectively. The VP6 analysis allowed subgrouping of strains and revealed that strains with SGI specificity were associated with NSP4A-KUN and strains with SGII specificity were associated with NSP4B-Wa. Analysis on the VP7 gene showed G1 strains within two lineages (G1-3 and G1-4); G2 strains within one lineage (G2-1); G5 strains clustered with other Brazilians G5 isolates and G9 strains within one lineage (G9-3). The VP4 gene analysis on P8 strains revealed two major genetic lineages, P8-2 and P8-3. This report describes an intragenotype diversity represented by lineages within rotavirus strains circulating in Rio de Janeiro. It will be important to continue molecular surveillance of rotavirus infections, particularly after introduction of vaccine in child population. These findings will help understand how rotavirus evolve and to measure how genetic diversity might affect the effectiveness of vaccination.

I. INTRODUÇÃO

1.1. Rotavírus

1.1.1. Breve Histórico

O interesse na causa da diarreia infantil estimulou a investigação de agentes etiológicos como bactérias, vírus e outros parasitos. Os rotavírus humanos foram primeiramente descritos por Bishop *et al.* (1973) em biópsias de intestino delgado de crianças com gastroenterite aguda de origem não-bacteriana. A análise pela microscopia eletrônica (ME) mostrou a ocorrência de vesículas citoplasmáticas contendo um grande número de partículas virais semelhantes aos orbivírus. Partículas virais semelhantes foram também detectadas por Flewett *et al.* (1973) ao examinarem pela ME fezes de crianças com diarreia aguda. Algumas de suas primeiras denominações foram *Orbivirus-like* (Bishop *et al.*, 1973), *Reovirus-like agent* (Kapikian *et al.*, 1974) e *Duovirus* (Davidson *et al.*, 1975), esta última relacionada às duas camadas protéicas observadas pela ME. Posteriormente foi proposto que o vírus constituísse um novo gênero na família *Reoviridae*, diferente dos gêneros *Reovirus* e *Orbivirus*, sugerindo-se *Rotavirus* para este novo gênero. O nome é derivado do latim *rota*, pelo aspecto da partícula semelhante a uma roda quando examinada por contrastação negativa pela ME (Flewett & Woode, 1978).

1.1.2. Classificação dos Rotavírus

Os rotavírus pertencem à família *Reoviridae*, a qual está organizada em 11 gêneros de vírus, entre eles o gênero *Rotavirus* (Mertens, 2004).

Estão classificados em sete sorogrupos distintos (A-G) dependendo dos diferentes epítomos presentes na proteína VP6. Os grupos A, B e C têm sido encontrados tanto em humanos quanto em animais, enquanto que os grupos D-G foram identificados, até o momento, somente em animais. Os rotavírus de grupo A são epidemiologicamente os mais importantes, sendo o principal responsável pelos episódios de diarreia aguda em crianças em todo o mundo (Kapikian *et al.*, 2001).

Dentro do grupo A são definidos subgrupos (SG) e sorotipos/genotipos segundo suas características sorológicas e moleculares. A proteína VP6 é responsável pela especificidade de diferentes SG, pela presença ou ausência de

epítomos imunoreativos frente a determinados anticorpos monoclonais, denominados como SGI, SGII, SGI+II e SG não I e não II (Greenberg *et al.*, 1983; Estes, 2001). O SGII é o mais freqüente entre os humanos, enquanto o SGI é mais detectado entre as amostras de origem animal (Iturriza-Gómara *et al.*, 2002). A classificação dos rotavírus consiste de um sistema binário que distingue sorotipos/genotipos distintos das proteínas VP4 denominados P (protease) e G (glicoproteína), respectivamente. Até o momento foram descritos 15 genotipos G de VP7 e 26 genotipos P de VP4 (Rahman *et al.*, 2005; Martella *et al.*, 2006). Devido a grande diversidade de genotipos existentes, tornou-se necessária uma nomenclatura consenso entre os autores para definir tanto sorotipos como genotipos de rotavírus. Descreve-se o P-tipo com o P acompanhado do número do sorotipo e/ou número do genotipo correspondente entre colchetes, e o G-tipo com o G acompanhado do número. Por exemplo, o isolado de rotavírus humano Wa seria **P1A[8]G1** (Tabelas 1 e 2). Cabe ressaltar que para a classificação de G, os sorotipos e genotipos têm números correlacionados. Enquanto que os de P não existem correlação.

Tabela 1. Classificação dos sorotipos e genotipos de VP7 (Estes, 2001)

VP7 (G) Sorotipo [Genotipo]	Rotavírus Humano	Rotavírus Animal	
3[3]	U371, U36, NUN1, NUN2, U372, P. MO, YO, RV-3, Ito, Nemoto, WI78, McN, AU-1, AU228, Ro1845, HCR3, 0264	U371 SA11, SA11-4fM MMU18006 CU-1, K9, RS-15 Cat2, Cat97, FRV-1 H-2, HI-23, FI-14, HO-5 CRW-8, C176, BEN-307 Ala, C11, R-2, BAP-2 EB, EW, EHP, EC, EL* LRFV1 Gottfried, SB-1A, BEN-144, SB-2 OSU, EE, TFR-41, C134 H-1 NCDV, UK, RF, WC3, Q17, OK, IND, B641, C486 LRFV2a Ch2 Ty1 ^d PO-13 993/83 678, J2538, A5, Cody	U371 Vervet monkey Rhesus monkey Dog Cat Horse Pig Rabbit Mouse Sheep Pig
4[4]	ST3, ST4, VA70, Hosokawa, Hochi, 57M	Gottfried, SB-1A, BEN-144, SB-2 OSU, EE, TFR-41, C134 H-1 NCDV, UK, RF, WC3, Q17, OK, IND, B641, C486 LRFV2a Ch2 Ty1 ^d PO-13 993/83 678, J2538, A5, Cody	Pig Horse Cow
5[5]	IAL28	OSU, EE, TFR-41, C134 H-1 NCDV, UK, RF, WC3, Q17, OK, IND, B641, C486 LRFV2a Ch2 Ty1 ^d PO-13 993/83 678, J2538, A5, Cody	Pig Horse Cow
6[6]	PA151, PA169, MG6	OSU, EE, TFR-41, C134 H-1 NCDV, UK, RF, WC3, Q17, OK, IND, B641, C486 LRFV2a Ch2 Ty1 ^d PO-13 993/83 678, J2538, A5, Cody	Pig Horse Cow
7[7]	None	OSU, EE, TFR-41, C134 H-1 NCDV, UK, RF, WC3, Q17, OK, IND, B641, C486 LRFV2a Ch2 Ty1 ^d PO-13 993/83 678, J2538, A5, Cody	Sheep Chicken Turkey Pigeon Cow Cow
8[8]	69M, B37, HMG89*, HAL1166, PA171, EGY1850, DG8	ISU-64 LRFV2c B223, V1005, KK3, 61A, Cr A44, KC-1 Lp14*, K923 P343 YM, A253 None L338 F123, FR4, FR8 Hg18* LRFV2c* S8*	Pig Sheep Cow
9[9]	WI61, F45, 116E, AU32, Mc323, US1205	ISU-64 LRFV2c B223, V1005, KK3, 61A, Cr A44, KC-1 Lp14*, K923 P343 YM, A253 None L338 F123, FR4, FR8 Hg18* LRFV2c* S8*	Pig Sheep Cow
10[10]	A64, Mc35, I321	ISU-64 LRFV2c B223, V1005, KK3, 61A, Cr A44, KC-1 Lp14*, K923 P343 YM, A253 None L338 F123, FR4, FR8 Hg18* LRFV2c* S8*	Pig Sheep Cow
11[11]	None	ISU-64 LRFV2c B223, V1005, KK3, 61A, Cr A44, KC-1 Lp14*, K923 P343 YM, A253 None L338 F123, FR4, FR8 Hg18* LRFV2c* S8*	Pig Sheep Cow
12[12]	L26, L27	ISU-64 LRFV2c B223, V1005, KK3, 61A, Cr A44, KC-1 Lp14*, K923 P343 YM, A253 None L338 F123, FR4, FR8 Hg18* LRFV2c* S8*	Pig Sheep Cow
13[13]	None	ISU-64 LRFV2c B223, V1005, KK3, 61A, Cr A44, KC-1 Lp14*, K923 P343 YM, A253 None L338 F123, FR4, FR8 Hg18* LRFV2c* S8*	Pig Sheep Cow
14[14]	None	ISU-64 LRFV2c B223, V1005, KK3, 61A, Cr A44, KC-1 Lp14*, K923 P343 YM, A253 None L338 F123, FR4, FR8 Hg18* LRFV2c* S8*	Pig Sheep Cow
Not tested [15]	None	ISU-64 LRFV2c B223, V1005, KK3, 61A, Cr A44, KC-1 Lp14*, K923 P343 YM, A253 None L338 F123, FR4, FR8 Hg18* LRFV2c* S8*	Pig Sheep Cow
1A[8]	Wa, KU, D, Mo, P, YO, MO VA70, Hochi, RV-4, WI78*, IAL28* WI61, F45, AU32, 89-12*, WI79* DS-1, S2, RV-5*, L26*, KUN* M37, ST3, 1076, McN RV-3*, US1205, HMG89*	ISU-64 LRFV2c B223, V1005, KK3, 61A, Cr A44, KC-1 Lp14*, K923 P343 YM, A253 None L338 F123, FR4, FR8 Hg18* LRFV2c* S8*	Pig Sheep Cow
1B[4]	None	ISU-64 LRFV2c B223, V1005, KK3, 61A, Cr A44, KC-1 Lp14*, K923 P343 YM, A253 None L338 F123, FR4, FR8 Hg18* LRFV2c* S8*	Pig Sheep Cow
2A[6]	None	ISU-64 LRFV2c B223, V1005, KK3, 61A, Cr A44, KC-1 Lp14*, K923 P343 YM, A253 None L338 F123, FR4, FR8 Hg18* LRFV2c* S8*	Pig Sheep Cow
2B[6]	None	ISU-64 LRFV2c B223, V1005, KK3, 61A, Cr A44, KC-1 Lp14*, K923 P343 YM, A253 None L338 F123, FR4, FR8 Hg18* LRFV2c* S8*	Pig Sheep Cow
3[9]	KE, AU-1*, PA151, AU228*	ISU-64 LRFV2c B223, V1005, KK3, 61A, Cr A44, KC-1 Lp14*, K923 P343 YM, A253 None L338 F123, FR4, FR8 Hg18* LRFV2c* S8*	Pig Sheep Cow
4[10]	None	ISU-64 LRFV2c B223, V1005, KK3, 61A, Cr A44, KC-1 Lp14*, K923 P343 YM, A253 None L338 F123, FR4, FR8 Hg18* LRFV2c* S8*	Pig Sheep Cow
4[12]	None	ISU-64 LRFV2c B223, V1005, KK3, 61A, Cr A44, KC-1 Lp14*, K923 P343 YM, A253 None L338 F123, FR4, FR8 Hg18* LRFV2c* S8*	Pig Sheep Cow
5A[3]	HCR3, Ro1845	ISU-64 LRFV2c B223, V1005, KK3, 61A, Cr A44, KC-1 Lp14*, K923 P343 YM, A253 None L338 F123, FR4, FR8 Hg18* LRFV2c* S8*	Pig Sheep Cow
5B[3]	None	ISU-64 LRFV2c B223, V1005, KK3, 61A, Cr A44, KC-1 Lp14*, K923 P343 YM, A253 None L338 F123, FR4, FR8 Hg18* LRFV2c* S8*	Pig Sheep Cow
5B[2]	None	ISU-64 LRFV2c B223, V1005, KK3, 61A, Cr A44, KC-1 Lp14*, K923 P343 YM, A253 None L338 F123, FR4, FR8 Hg18* LRFV2c* S8*	Pig Sheep Cow
6[1]	None	ISU-64 LRFV2c B223, V1005, KK3, 61A, Cr A44, KC-1 Lp14*, K923 P343 YM, A253 None L338 F123, FR4, FR8 Hg18* LRFV2c* S8*	Pig Sheep Cow
7[5]	A64*	ISU-64 LRFV2c B223, V1005, KK3, 61A, Cr A44, KC-1 Lp14*, K923 P343 YM, A253 None L338 F123, FR4, FR8 Hg18* LRFV2c* S8*	Pig Sheep Cow
8[11]	116E*, 1321*	ISU-64 LRFV2c B223, V1005, KK3, 61A, Cr A44, KC-1 Lp14*, K923 P343 YM, A253 None L338 F123, FR4, FR8 Hg18* LRFV2c* S8*	Pig Sheep Cow
9[7]	None	ISU-64 LRFV2c B223, V1005, KK3, 61A, Cr A44, KC-1 Lp14*, K923 P343 YM, A253 None L338 F123, FR4, FR8 Hg18* LRFV2c* S8*	Pig Sheep Cow
10[16]	None	ISU-64 LRFV2c B223, V1005, KK3, 61A, Cr A44, KC-1 Lp14*, K923 P343 YM, A253 None L338 F123, FR4, FR8 Hg18* LRFV2c* S8*	Pig Sheep Cow
11[14]	PA169, Mc35, GR67/91*, DG8 HAL1166, EGY1850*, MG6	ISU-64 LRFV2c B223, V1005, KK3, 61A, Cr A44, KC-1 Lp14*, K923 P343 YM, A253 None L338 F123, FR4, FR8 Hg18* LRFV2c* S8*	Pig Sheep Cow
12[19]	Mc323	ISU-64 LRFV2c B223, V1005, KK3, 61A, Cr A44, KC-1 Lp14*, K923 P343 YM, A253 None L338 F123, FR4, FR8 Hg18* LRFV2c* S8*	Pig Sheep Cow
13[20]	None	ISU-64 LRFV2c B223, V1005, KK3, 61A, Cr A44, KC-1 Lp14*, K923 P343 YM, A253 None L338 F123, FR4, FR8 Hg18* LRFV2c* S8*	Pig Sheep Cow
Not tested [13]	None	ISU-64 LRFV2c B223, V1005, KK3, 61A, Cr A44, KC-1 Lp14*, K923 P343 YM, A253 None L338 F123, FR4, FR8 Hg18* LRFV2c* S8*	Pig Sheep Cow
Not tested [15]	None	ISU-64 LRFV2c B223, V1005, KK3, 61A, Cr A44, KC-1 Lp14*, K923 P343 YM, A253 None L338 F123, FR4, FR8 Hg18* LRFV2c* S8*	Pig Sheep Cow
Not tested [17]	None	ISU-64 LRFV2c B223, V1005, KK3, 61A, Cr A44, KC-1 Lp14*, K923 P343 YM, A253 None L338 F123, FR4, FR8 Hg18* LRFV2c* S8*	Pig Sheep Cow
Not tested [18]	None	ISU-64 LRFV2c B223, V1005, KK3, 61A, Cr A44, KC-1 Lp14*, K923 P343 YM, A253 None L338 F123, FR4, FR8 Hg18* LRFV2c* S8*	Pig Sheep Cow
Not tested [21]	None	ISU-64 LRFV2c B223, V1005, KK3, 61A, Cr A44, KC-1 Lp14*, K923 P343 YM, A253 None L338 F123, FR4, FR8 Hg18* LRFV2c* S8*	Pig Sheep Cow

Note: Asterisks indicate strains that were not tested by neutralization; relationship suggested by amino acid sequence and/or nucleic acid hybridization analyses.
^aVP7 (G) serotype determined by reciprocal cross-neutralization.
^bVP4 (F) serotype determined by reciprocal or one-way cross-neutralization.
^cVP7 or VP4 genotype determined by comparative amino acid sequence analysis and/or nucleic acid hybridization.
^dRecent amino acid sequence analysis of VP7 gene of Ty1 suggests that the virus may not belong to G serotype 7.
Source: From ref. 216, with additions (from refs. 1, 21, 94, 211, 274, 377, 382, 398, 403, 431) and slight modifications, and with permission.

Tabela 2. Classificação dos sorotipos e genótipos de VP4 (Estes, 2001)

VP4 (P) Sorotipo [Genótipo]	Rotavírus Humano	Rotavírus Animal	
TABLE 1. Serotypic and genotypic classification of group A rotavirus VP7 and VP4			
VP7 (G) Serotype ^a [Genótipo ^b]	Human rotavirus strain	Animal rotavirus	
		Strain	
		Species	
1[1]	Wa, KU, D, M37, RV-4, Mo, W179, K8, GR67/91*, 89-12	C60, C86, C95, S8*	Pig
2[2]	DS-1, S2, KUN, RV-5, 1076	T449	Cow
3[3]	P, MO, YO, RV-3, Ito, Nemoto, W178, McN, AU-1, AU228, Ro1845, HCR3, 0264	C134 SA11, SA11-4fM MMU18006 CU-1, K9, RS-15 Cat2, Cat97, FRV-1 H-2, HI-23, FI-14, HO-5 CRW-8, C176, BEN-307 Ala, C11, R-2, BAP-2 EB, EW, EHR, EC, EL* LFRV1	Pig Vervet monkey Rhesus monkey Dog Cat Horse Pig Rabbit Mouse Sheep Pig
4[4]	ST3, ST4, VA70, Hosokawa, Hochi, 57M	Gottfried, SB-1A, BEN-144, SB-2	Pig
5[5]	IAL28	OSU, EE, TFR-41, C134	Horse
6[6]	PA151, PA169, MG6	H-1 NCDV, UK, RF, WC3, Q17, OK, IND, B641, C486	Cow
7[7]	None	LFRV2a Ch2	Sheep Chicken
8[8]	69M, B37, HMG89*, HAL1166, PA171, EGY1850, DG8	Ty19 PO-13 993/83 678, J2538, A5, Cody	Turkey Pigeon Cow Cow
9[9]	W161, F45, 116E, AU32, Mc323, US1205	ISU-64 LFRV2c	Pig Sheep
10[10]	A64, Mc35, I321	B223, V1005, KK3, 61A, Cr A44, KC-1 Lp14*, K923 P343 YM, A253	Cow Sheep Pig Pig
11[11]	None	None	—
12[12]	L26, L27	L338	Horse
13[13]	None	F123, FR4, FR8	Horse
14[14]	None	Hg18*	Cow
Not tested [15]	None	LFRV2c*	Sheep
1A[8]	Wa, KU, D, Mo, P, YO, MO VA70, Hochi, RV-4, W178*, IAL28* W161, F45, AU32, 89-12*, W179* DS-1, S2, RV-5*, L26*, KUN* M37, ST3, 1076, McN RV-3*, US1205, HMG89*	S8*	Pig
1B[4]	None	None	—
2A[6]	None	None	—
2B[6]	None	Gottfried, BEN-144	Pig
3[9]	K8, AU-1*, PA151, AU228*	FRV-1*, Cat2*	Cat
4[10]	57M, 69M, B37*	None	—
4[12]	None	H-2, FI-14, FI23*	Horse
5A[3]	HCR3, Ro1845	CU-1, K9, RS-15*	Dog
5B[3]	None	Cat97	Cat
5B[2]	None	MMU18006	Rhesus monkey
6[1]	None	NCDV, C486, J2538 A5*, Cody, Q17 SA11-4fM LFRV1*	Vervet monkey Sheep Cow
7[5]	A64*	UK, B641, IND*, OK* 61A*, WC3*, 678 P343*	Pig
8[11]	116E*, 1321*	B223, Cr*, A44*, KK3* LFRV2a*	Cow Sheep
9[7]	None	OSU, TFR-41, C134* CRW-8, BEN-307, SB-1A, C60*, C95* YM, A253	Pig
10[16]	None	H-1	Horse
11[14]	PA169, Mc35, GR67/91*, DG8 HAL1166, EGY1850*, MG6 Mc323	EB, EW, EC, EL Ala, C11, R-2, BAP-2*	Mouse Rabbit
12[19]	None	4F*	Pig
13[20]	None	EHP	Mouse
Not tested [13]	None	MDR-13	Pig
Not tested [15]	None	Lp14, K923	Sheep
Not tested [17]	None	993/83	Cow
Not tested [18]	None	PO-13	Pigeon
Not tested [21]	None	L338 Hg18	Horse Cow

Note: Asterisks indicate strains that were not tested by neutralization; relationship suggested by amino acid sequence and/or nucleic acid hybridization analyses.

^aVP7 (G) serotype determined by reciprocal cross-neutralization.

^bVP4 (P) serotype determined by reciprocal or one-way cross-neutralization.

^cVP7 or VP4 genotype determined by comparative amino acid sequence analysis and/or nucleic acid hybridization.

^dRecent amino acid sequence analysis of VP7 gene of Ty1 suggests that the virus may not belong to G serotype 7.

Source: From ref. 216, with additions (from refs. 1, 21, 94, 211, 274, 377, 382, 398, 403, 431) and slight modifications, and with permission.

1.1.3. Partícula Viral

A partícula viral completa é não-envelopada, com simetria icosaédrica, e mede aproximadamente 70nm de diâmetro. Estruturalmente os rotavírus são formados por três camadas protéicas, assim distribuídas: capsídeo externo, capsídeo intermediário e o capsídeo interno, onde se encontra o RNA fita dupla (dsRNA) (**Figura 1**). Associadas ao dsRNA no capsídeo interno, encontram-se três proteínas estruturais: VP1, VP2 e VP3, codificadas pelos segmentos 1, 2 e 3, respectivamente. Essas proteínas representam em conjunto aproximadamente 18% das proteínas virais. O capsídeo intermediário é formado pela proteína VP6, codificada pelo segmento 6, sendo esta a mais abundante (51%) e uma das mais importantes proteínas estruturais. No capsídeo externo encontram-se as proteínas estruturais: VP4, codificada pelo gene 4 e responsável pelos sorotipos/genotipos P; e VP7, codificada pelos genes 7 (*Rhesus sp.*) ou 8 (rotavírus bovino UK) ou 9 (SA-11), determinante dos sorotipos/genotipos G. Outras cinco proteínas não-estruturais são codificadas pelos segmentos genômicos restantes, sendo assim denominadas: NSP1, NSP2, NSP3, NSP4 e NSP5 (Kapikian *et al.*, 2001).

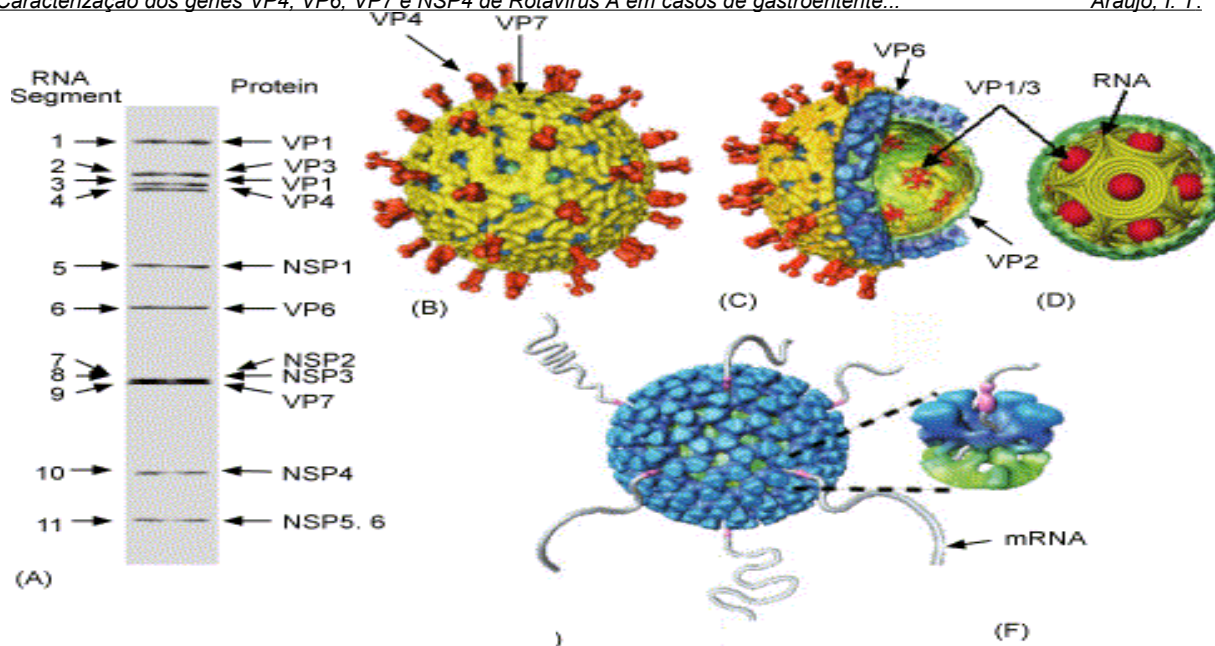


Figura 1. Estrutura da partícula de rotavírus (SA-11). Localização das proteínas estruturais (adaptada de Jayaram *et al.*, 2004). As proteínas estruturais estão representadas pela sigla VP.

1.1.3.1. Genoma Viral

Os rotavírus possuem 11 segmentos distintos de dsRNA, sendo que cada um destes segmentos codifica para uma proteína estrutural ou não-estrutural específica. Representam os únicos agentes virais conhecidos por possuir 11 segmentos de dsRNA infectando tanto mamíferos como aves. Os segmentos variam em tamanho de 667 a 3.302 pares de bases (pb), do menor para o maior gene. Esta diferença de tamanho permite que os segmentos sejam separados por eletroforese, apresentando um padrão típico e único dos rotavírus, o que facilitou o desenvolvimento de um método de diagnóstico para estes vírus. O padrão eletroforético dos rotavírus de grupo A apresenta 4 segmentos de RNA de alto peso molecular (segmentos de 1 a 4), 5 segmentos de médio peso molecular (segmentos de 5 a 9) e 2 segmentos de baixo peso molecular (segmentos 10 e 11). Os grupos de rotavírus de B a G revelam migrações distintas, sendo estes denominados rotavírus atípicos (**Figura 2**) (Estes, 2001).

Além dos grupos e sorotipos/genótipos, a classificação dos rotavírus é também realizada pela análise da mobilidade dos segmentos 10 e 11 de seu dsRNA através da eletroforese em gel de poliácridamida (EGPA). Os rotavírus de grupo A

podem ser caracterizados por três distintos perfis: "perfil eletroforético longo", por diferenças de mobilidade do segmento 11 e "perfil eletroforético curto" e "super curto", quando as diferenças de mobilidade ocorrem no segmento 10 (Taniguchi & Urasawa, 1995). Assim, com poucas exceções, todos os rotavírus humanos de SG I possuem um perfil eletroforético curto ou super curto, possuindo especificidade pelo genótipo G2. Por outro lado, o SG II apresenta em sua maioria perfil eletroforético longo com especificidade pelos demais genótipos (Kapikian *et al.*, 2001).

As partículas virais contêm sua própria RNA polimerase dependente de RNA a fim de transcrever cada segmento de RNA em RNAs mensageiros. A fita positiva de cada segmento possui na sua extremidade uma seqüência 5'-guanidina seguida de uma seqüência conservada que faz parte da região 5' não-codificante. Cada um dos segmentos de dsRNA possui uma fase de leitura aberta (ORF) que codifica para os produtos protéicos. A ORF é finalizada em um códon terminador seguido de outra seqüência conservada, agora localizada na região 3' não-codificante, e possui na sua extremidade uma seqüência terminal 3'-citidina (Estes, 2001).

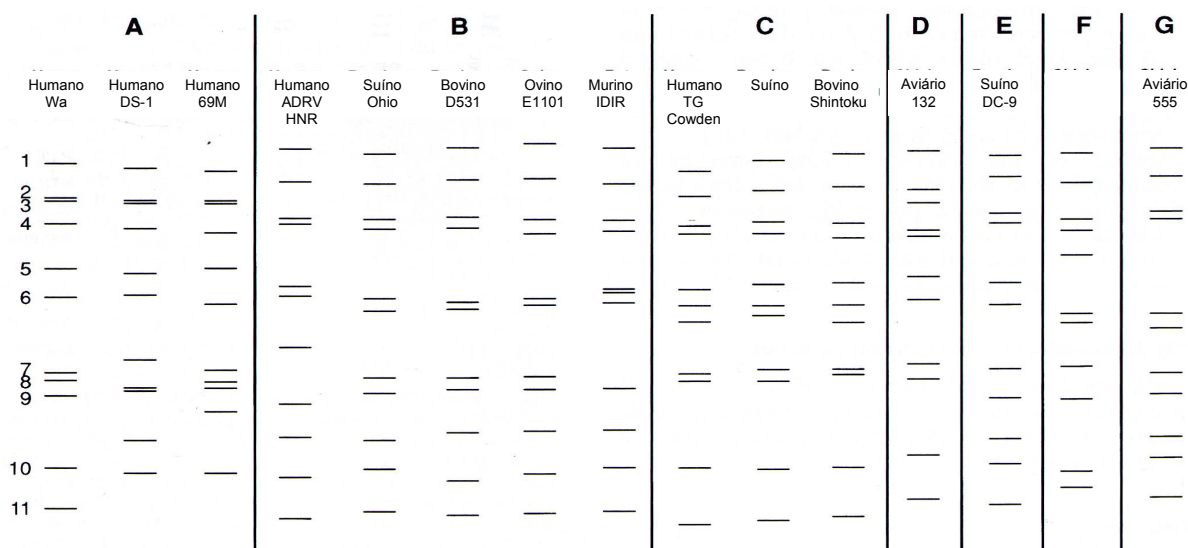


FIG. 5. Schematic diagram of electrophoretic migration patterns of RNAs of representative rotaviruses belonging to groups A to G.

Figura 2. Esquema representativo dos eletroferotipos dos diferentes grupos de rotavírus analisados em gel de poli-acrilamida. (Adaptada de Kapikian e Chanock, 2001)

Mecanismos de evolução dos Rotavírus. Devido à natureza segmentada do genoma, nem sempre se observa o padrão eletroforético descrito nos protótipos virais. Um dos aspectos mais observados nos estudos de diversidade genética entre os rotavírus tem sido o polimorfismo eletroforético exibido pelos

segmentos de dsRNA. A diversidade está relacionada com diferentes mecanismos genéticos como as mutações pontuais, os rearranjos (recombinação intramolecular) e os *reassortments* (Iturriza-Gomara *et al.*, 2001).

O acúmulo de mutações pontuais tem sido observado em isolados obtidos em surtos, utilizando as técnicas de mapeamento de nucleotídeos e seqüenciamento. Algumas dessas mutações são conservadas e passam para a progênie onde podem se acumular. Essas mutações podem ser usadas para definir novas linhagens e sublinhagens dentro de um mesmo genotipo, tornando-se úteis para classificação e de importância epidemiológica. Dessa forma, é necessária uma análise sistemática de seqüência dos isolados para identificar a freqüência dessas mutações nos segmentos de rotavírus (Iturriza-Gomara *et al.*, 2001).

Os rearranjos representam alterações na seqüência do segmento genômico, algumas vezes na forma de deleção ou mais freqüentemente como duplicação. A visualização deste tipo de mecanismo pela eletroforese em EGPA caracteriza-se pela ausência de alguns segmentos da sua posição usual e/ou o aparecimento de bandas adicionais com mobilidades diferentes (Taniguchi & Urasawa, 1995). Pedley e colaboradores (1984) investigaram rotavírus isolados de crianças imunodeficientes e observaram variação na mobilidade dos segmentos do dsRNA pela EGPA. Com isso, vieram as primeiras descrições de que tais variações ocorriam não somente em crianças imunodeficientes, mas também em animais e crianças sadias (Desselberger, 1996). Os rearranjos resultam de erros de transcrição de um único segmento e possuem nada mais do que a seqüência de um gene. Na maioria das vezes os genomas com rearranjos surgem como produtos de uma duplicação parcial da ORF do genoma, com variadas conseqüências relativas à sua expressão. Provavelmente, no momento da transcrição, por uma falha da RNA-polimerase RNA-dependente, ela retorne a 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 produzirem proteínas de tamanho anormal. Os vírus com segmentos de genoma rearranjados são geneticamente estáveis e reestruturam seus segmentos em infecções mistas (Desselberger, 1996).

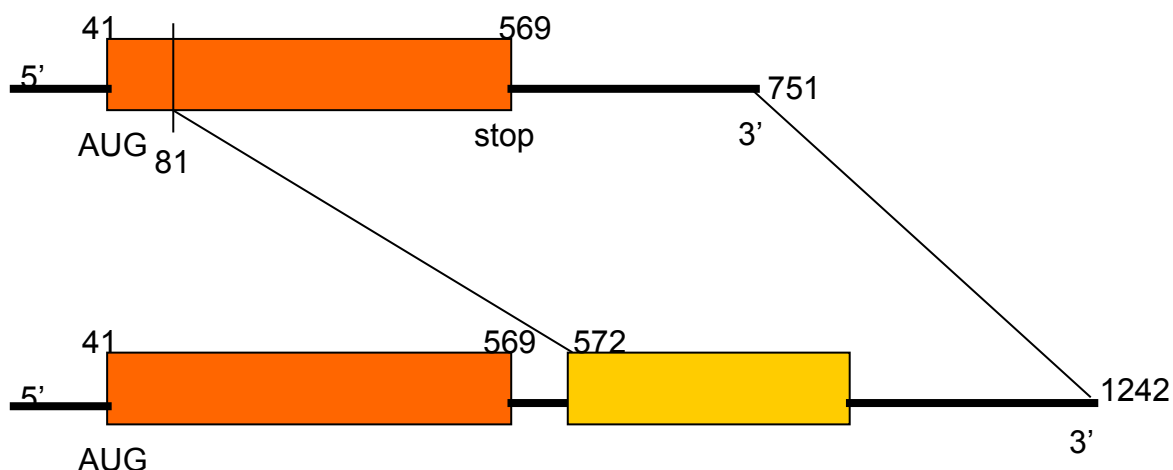


Figura 3. Estruturas rearranjadas de segmentos de genoma de rotavírus contendo duplicação parcial da ORF. Este tipo de rearranjo pode ocorrer na maioria dos segmentos.

Os *reassortments* foram descritas por Matsuno *et al.* (1980) quando através da co-infecção em cultura celular de rotavírus bovino (Lincoln) e rotavírus símio (SA-11), obtiveram o primeiro clone reestruturado. Através de comparações eletroforéticas dos segmentos de dsRNA 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. As reestruturações *in natura* que resultam em variantes não usuais, têm sido descritos (Mascarenhas *et al.*, 1989; Krishnam *et al.*, 1994), bem como isolados com especificidade animal, sendo encontrados em outras espécies (Nakagomi & Nakagomi, 1991; Beards *et al.*, 1992; Brussow *et al.*, 1992; Taniguchi *et al.*, 1994; Palombo & Bishop, 1995; Alfieri *et al.*, 1996; Timenetsky *et al.*, 1997). Todavia, esses isolamentos 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, animais domésticos e outros animais, proporcionando, assim, infecções mistas e, conseqüentemente, maior possibilidade de ocorrer os *reassortments* (Cook *et al.*, 2004).

Transmissão interespecíes. A transmissão de rotavírus do animal para os humanos é mais provável de ocorrer nos países em desenvolvimento, onde em geral as pessoas vivem sob precárias condições de higiene e tem maior contato com animais, principalmente, bovinos, suínos e aves (Jain *et al.*, 2001).

Os rotavírus suínos são mais semelhantes aos rotavírus humanos para os genes VP4, VP6, NSP1, NSP3 e NSP4 (Dunn *et al.*, 1994; Rao *et al.*, 1995). Análise filogenética dos genes estruturais e não estruturais tem indicado um consistente padrão evolucionário entre certos vírus de origem humana e animal com a comparação da VP6, NSP1, NSP3, NSP4 e NSP5 (Dunn *et al.*, 1994; Cunliffe *et al.*, 1997; Fujiwara & Nagakomi, 1997; Horie *et al.*, 1997; Kirkwood & Palombo, 1997; Iturriza Gomara *et al.*, 2003).

Vários segmentos genômicos de rotavírus parecem estar envolvidos como potenciais determinantes de restrição ao hospedeiro e virulência. Contudo, o entendimento da base molecular na restrição das espécies e a virulência dos rotavírus, são ainda dificultados pela ausência de dados de seqüenciamento do genoma completo de amostras de rotavírus (Matthijnssens *et al.*, 2006). Até o momento, o genoma de apenas seis isolados de rotavírus foram seqüenciados completamente: a amostra de símio, SA11 P[2]G3, a amostra de aves PO-13 P[17]G7, duas de rotavírus humano, amostras KU, P[8]G1 e TB-Chen, P[4]G2 e as amostras de rotavírus bovino RF, P[1]G6 e UK, P[5]G6, com a seqüência completa disponibilizada no banco de genes (Kapikian *et al.*, 2001).

No Brasil, vários trabalhos têm mostrado a ocorrência de amostras de origem suína, especificamente os sorotipos G5 e G9 causando diarreia em crianças sugerindo uma constante troca de material genético entre as amostras de rotavírus humano e animal (Alfieri *et al.*, 1996; Leite *et al.*, 1996; Timenetsky *et al.*, 1997; Gouvea & Santos, 1999; Araújo *et al.*, 2001; Mascarenhas *et al.*, 2002; Santos *et al.*, 2005).

1.1.3.2. Proteínas estruturais

VP1. Encontra-se no capsídeo interno e faz parte do complexo de replicação. Junto com a proteína VP3 participa do complexo de transcrição do vírion, atuando com uma RNA polimerase dependente de RNA. Entre as proteínas do *core* é a única que possui uma seqüência específica de reconhecimento ao RNA viral (Mertens, 2004).

VP2. Proteína mais abundante no *core*. Faz parte do complexo de replicação devido a sua capacidade de ligar-se ao dsRNA através de seus resíduos N-terminais (Jayaram *et al.*, 2004).

VP3. Proteína também encontrada no capsídeo interno. Possui atividade guanidiltransferase, metiltransferase e participa do complexo de transcrição do vírion junto com a proteína VP1, ligando-se ao RNA fita simples (Mertens, 2004).

VP4. Proteína não glicosilada que forma projeções diméricas a partir do capsídeo externo de vírions maduros (Both *et al.*, 1994). Tem sido descrita como determinante dos eventos funcionais importantes como adesão à célula, internalização, hemaglutinação e neutralização (Dunn *et al.*, 1995; Ludert *et al.*, 1996). A VP4 é susceptível à tripsina, o que resulta no aumento da infectividade viral e facilita a entrada do vírus na célula. Durante a proteólise, VP4 é clivada em VP5* e VP8* que permanecem associadas ao vírion. O peptídeo VP5* está associado com a atividade de neutralização cruzada entre os diferentes tipos de VP4 e, possivelmente, possui os epítomos responsáveis pela adsorção do vírus à célula. O peptídeo VP8*, por outro lado, contém a maioria dos epítomos associados às reações tipo-específicas (Jayaram *et al.*, 2004) (**Figura 4**).

VP 4

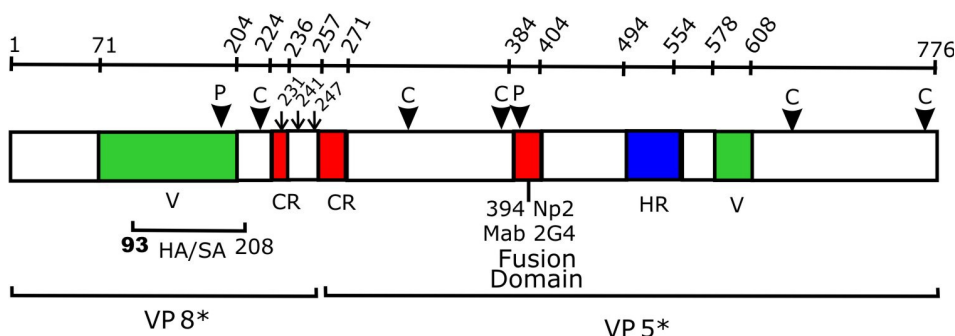


Figura 4. Organização do segmento genômico que codifica a proteína VP4 de Rotavírus (Adaptada de Taniguchi & Urasawa, 1995).

VP6. Proteína viral mais abundante e a principal portadora dos determinantes antigênicos que permitem classificar os rotavírus em diferentes grupos (A-G) e subgrupos (I, II, I+II, não-I e não-II). Encontra-se no capsídeo intermediário e está formada por dois domínios, um interagindo com a proteína VP7 e outro com a VP2. Desta maneira tem participação em duas funções importantes do vírus, a entrada na célula e transcrição do dsRNA (Estes, 2001). O domínio de trimerização se situa entre os aminoácidos 246 e 315, e o domínio necessário para a formação das partículas de dupla camada está localizada entre os aminoácidos (aa)

281 e 397 (**Figura 5**). Os resíduos 296 a 259 e 305, são importantes no reconhecimento pelos anticorpos monoclonais (MAbs) de subgrupo (Kapikian *et al.*, 2001).

VP 6

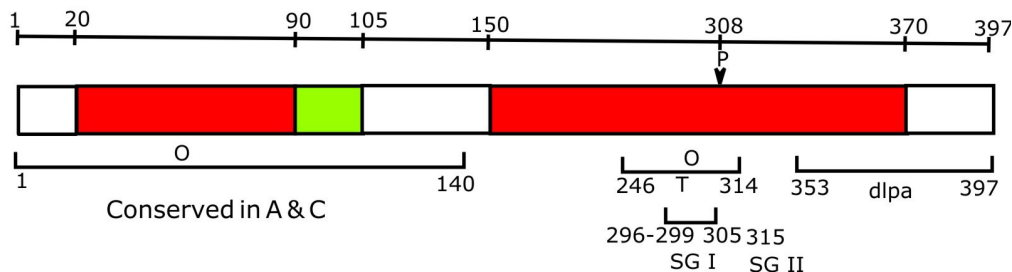


Figura 5. Organização do segmento genômico que codifica a proteína VP6 de Rotavírus (Adaptada de Taniguchi & Urasawa, 1995).

VP7. Glicoproteína mais imunogênica do capsídeo externo, induzindo a síntese de anticorpos neutralizantes. A proteína VP7 pode modular a atividade da VP4 no processo de adsorção e entrada do rotavírus na célula. Tem a capacidade de interagir com moléculas da superfície celular, uma vez que a proteína VP4 tenha iniciado o processo de adsorção (Jayaram *et al.*, 2004). Diferentes estudos têm demonstrado que concentrações apropriadas de cálcio (Ca^{++}) são necessárias para se manter a estabilidade da partícula, aparentemente pela estabilidade da glicoproteína VP7. O tratamento de partículas virais utilizando agentes quelantes de Ca^{++} (EGTA ou EDTA) resulta na remoção do capsídeo externo através da dissociação dos trímeros de VP7 e, conseqüentemente, a perda de infectividade. Baixas concentrações de Ca^{++} , semelhantes às do citoplasma, gera partículas incompletas ou *double-layered particles* (DLPs) que são ativas para transcrição e necessárias no ciclo de replicação dos rotavírus (Estes, 2001). A VP7 apresenta uma ORF composta de 326 aa com dois códons de iniciação (**Figura 6**). Cada uma dessas regiões precede domínios hidrofóbicos designados de H1 (aa 6-23) e H2 (aa 33-44), que podem funcionar com uma seqüência sinalizadora para dirigir a VP7 para o retículo endoplasmático (RE). Um terceiro códon de iniciação também está presente antes do segundo domínio hidrofóbico. Algumas amostras do vírus contêm até três sítios potenciais de glicosilação, contudo, somente dois sítios são aparentemente usados (Kapikian *et al.*, 2001)

VP 7

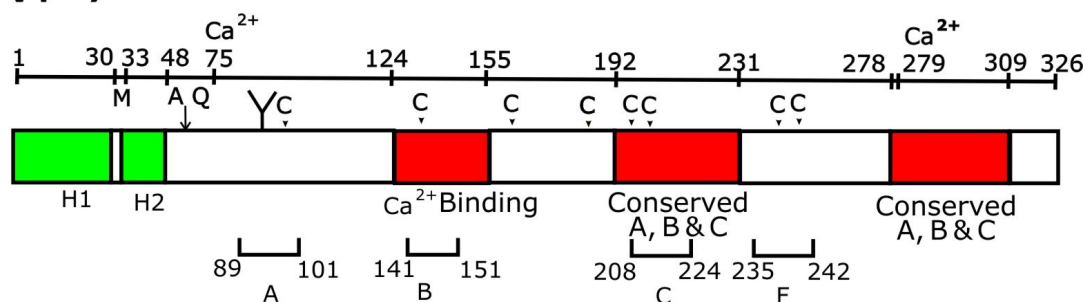


Figura 6. Organização do segmento genômico que codifica a proteína VP7 de Rotavírus (Adaptada de Taniguchi & Urasawa, 1995).

1.1.3.3. Proteínas não-estruturais

NSP1. Proteína codificada pelo segmento 5. Apresenta associações com o citoesqueleto celular favorecendo a ligação do vírus à célula. É a proteína viral menos conservada, mostrando maior variabilidade de seqüência do que VP4 e VP7. Possui domínios relativamente conservados (*zinc finger*), porém não se encontram presentes em todas as variantes, mostrando não ser uma proteína essencial na replicação do vírus (Estes, 2001; Mertens, 2004).

NSP2. Proteína codificada pelo segmento 8. Altamente conservada, esta proteína se expressa em altos níveis em células infectadas e está localizada nos viroplasmas. Sua associação com a NSP5 faz com que essas duas proteínas estejam envolvidas na replicação e encapsidação do RNA. A NSP2 possui ainda atividade desestabilizadora de hélices de ácidos nucléicos e atividade NTPase (Estes, 2001; Mertens, 2004).

NSP3. Proteína envolvida na regulação da tradução. Tem conformação de um homodímero que reconhece a seqüência consenso 3' do RNA mensageiro (RNAm), o que favorece a tradução dos transcritos de RNAm aos ribossomos e ainda previne a degradação dos mesmos por nucleases celulares (Jayaram *et al.*, 2004).

NSP4. Proteína codificada pelo segmento 10 e tem sido estudada por sua importância na morfogênese e virulência. A NSP4 possui três domínios hidrofóbicos, H1, H2 e H3 localizados na porção N-terminal. Possui dois sítios de glicosilação situando-se em uma pequena alça no lúmen do retículo endoplasmático; um domínio transmembrana; um domínio de oligomerização; um sítio de ligação com a VP4 e uma região com cerca de 20 aa para a ligação com o capsídeo imaturo (VP6) (**Figura 7**) (Bowman *et.al.*, 2000; Huang *et.al.*, 2004). Um estudo realizado por Browne *et al.*, (2000) mostra que o peptídeo correspondente aos resíduos 48-91 aa, é capaz de promover uma desestabilização da membrana do RE com conseqüente lise do mesmo, levando a um aumento do Ca^{++} intracelular, efeito que é potencializado na presença do peptídeo 48-175. O aumento do nível de Ca^{++} intracelular ocasiona o acréscimo de secreção de íons Cl^{-} , provocando assim uma diarreia de natureza secretória. (Tian *et.al.*, 1995; Estes, 2001; Huang *et.al.*, 2004). Na morfogênese do vírus, a NSP4 atua como receptor intracelular na membrana do RE para as DLPs durante o processo de maturação, além de ser um receptor para VP4. Participa também no transporte dessas partículas através do RE e na formação de partículas com envelope transitório. Neste processo atua como um desestabilizante de membrana que permite a remoção do envoltório transitório dessas partículas durante a montagem de partículas maduras (Taylor & Bellamy, 2003). A NSP4 é capaz de ativar os canais dependentes de Ca^{++} no intestino e vem sendo descrita como a primeira enterotoxina viral.

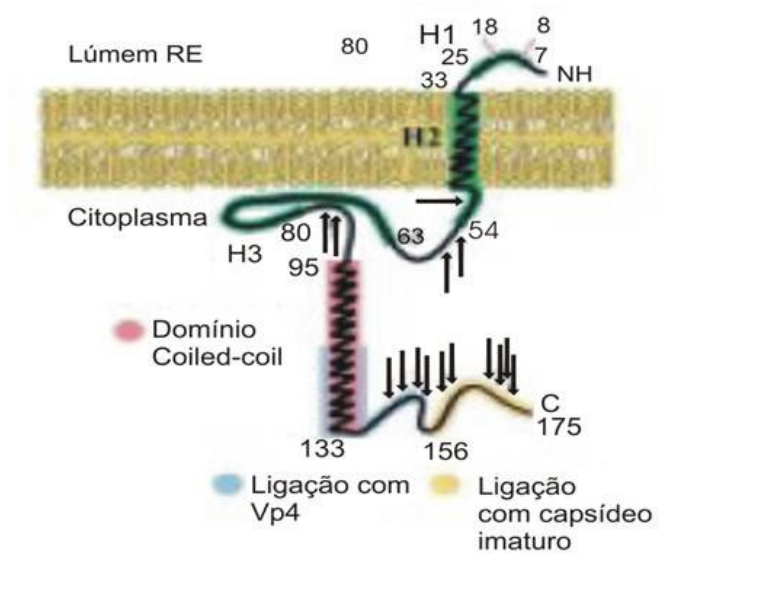


Figura 7. Representação esquemática da NSP4 (adaptada de Bowman *et al.*, 2000).

Um resíduo de aa na posição 114-135 da proteína NSP4 foi descrito como sendo capaz de induzir a diarreia em camundongos recém-natos e que as mudanças na atividade toxigênica e virulência dos rotavírus têm sido associadas às alterações dos aminoácidos neste resíduo (Ball *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1998) (**Figura 8**). Diferenças entre as seqüências de NSP4 de rotavírus causando infecções sintomáticas e assintomáticas têm sido descritas em alguns estudos (Zhang *et al.*, 1998; Kirkwood *et al.*, 1999; Pager *et al.*, 2000). Os anticorpos produzidos pela NSP4 reduzem a sua própria capacidade de induzir diarreia. Em um estudo com camundongos vacinados com NSP4 foi observada a indução de proteção homotípica e heterotípica contra diarreia por rotavírus (Estes *et al.*, 2001). Em humanos, a NSP4 foi descrita como sendo capaz de induzir resposta imune celular e humoral (Johansen *et al.*, 1999).

Análises de seqüências do gene da NSP4 classificaram 5 distintos genogrupos para esta proteína: A-KUN, B-Wa, C-AU1, D-EW e E-Avian-like. Observou-se que o genogrupo NSP4A está associado com o subgrupo I de rotavírus humano, enquanto que o genogrupo NSP4B está associado ao subgrupo II (Mori *et al.*, 2002; Lin & Tian, 2003).

NSP4

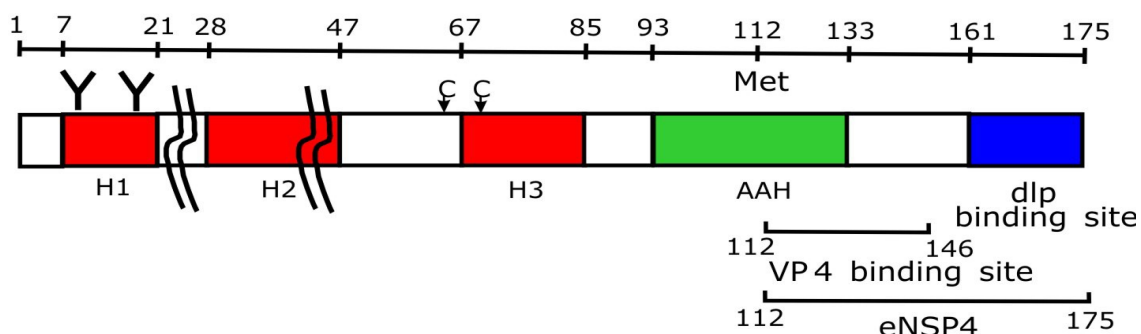


Figura 8. Organização do segmento genômico que codifica a proteína NSP4 de Rotavírus (Adaptada de Taniguchi & Urasawa, 1995).

NSP5. Proteína codificada pelo segmento 11. Possui atividade autoquinase e em células infectadas apresenta formas hipo e hiper fosforiladas (Taraporewala *et al.*, 2004). Quando a NSP5 é expressa em células não infectadas a NSP2 induz a hiper fosforilação de NSP5, mostrando a interação dessas duas proteínas. Durante o processo de replicação NSP2, NSP5 e NSP6 estão associadas na formação de viroplasmata (Estes, 2001).

NSP6. Proteína codificada por uma ORF do segmento 11. A NSP6 é encontrada principalmente nos viroplasmata e interage com NSP5, evidenciando sua participação nos processos de replicação e encapsidação do vírus. Tem sido proposto que algumas variantes dos grupos A e C de rotavírus não codifiquem esta proteína (Estes, 2001; Taraporewala *et al.*, 2004).

1.1.4. Replicação

Os rotavírus possuem um tropismo celular *in vivo* pelos enterócitos maduros das vilosidades intestinais. A replicação ocorre no citoplasma das células absortivas diferenciadas, localizadas no terço apical das vilosidades do intestino delgado. As partículas infecciosas são liberadas no lúmen intestinal e o processo replicativo tem continuidade na área distal do intestino delgado (Estes, 2001)

O capsídeo externo está envolvido na adesão celular, penetração da membrana e entrada na célula. A infectividade dos rotavírus *in vitro* é aumentada e dependente da presença de tripsina; este tratamento proteolítico resulta na clivagem de VP4, gerando os polipeptídeos VP5* e VP8* que são importantes no processo de internalização das partículas nas células (Zárate *et al.*, 2000). Estudos recentes mostram que a entrada dos rotavírus nas células envolve interações com receptores celulares contendo ácido siálico (AS) e integrinas no início do processo de adsorção. Nesse processo, o domínio VP8* interage com AS e VP5* com integrinas. (Hewish *et al.*, 2000; Guerrero *et al.*, 2000; Lopes y Arias, 2004).

Após a entrada no interior da célula do hospedeiro ocorre a perda do capsídeo externo e ativação da transcrição. Os RNAs mensageiros recém sintetizados possuem duas funções: como RNAm a fim de dirigir a tradução das proteínas virais e como moldes para a síntese do RNA de polaridade negativa para a replicação do genoma. A montagem das partículas e replicação dos segmentos do genoma, assim como a morfogênese das DLPs acontecem em estruturas eletrodensas denominadas viroplasmas, que compõem grande quantidade de RNA e proteínas virais (VP1, VP2, VP3 e VP6; NSP2, NSP5 e NSP6) (**Figura 9**). Depois de formadas, as DLPs migram para o sítio único de maturação nas células que é o lúmen do RE (Estes, 2001; Lopes y Arias, 2004).

Duas proteínas são sintetizadas em associação com o RE e estão glicosiladas: a proteína estrutural VP7, que forma o capsídeo externo, é sintetizada no RE e se mantém associada à membrana do RE; e a proteína não-estrutural NSP4, também glicosilada e residente no RE, que possui domínio transmembrana com resíduos carboxi-terminais voltados para o citoplasma da célula. Este domínio citoplasmático funciona como receptor das DLPs, interagindo diretamente com VP6 e VP4, viabilizando o brotamento das DLPs para o interior do RE. Durante este brotamento as partículas adquirem um envoltório lipídico transitório que se perde durante a passagem no RE. Em seguida, ocorre a montagem das proteínas do capsídeo externo, o que resulta na formação de partículas virais maduras. Finalmente, o ciclo infeccioso termina quando a progênie viral é liberada por lise da célula hospedeira (Estes, 2001; Jayaram *et al.*, 2004; Lopes y Arias, 2004).

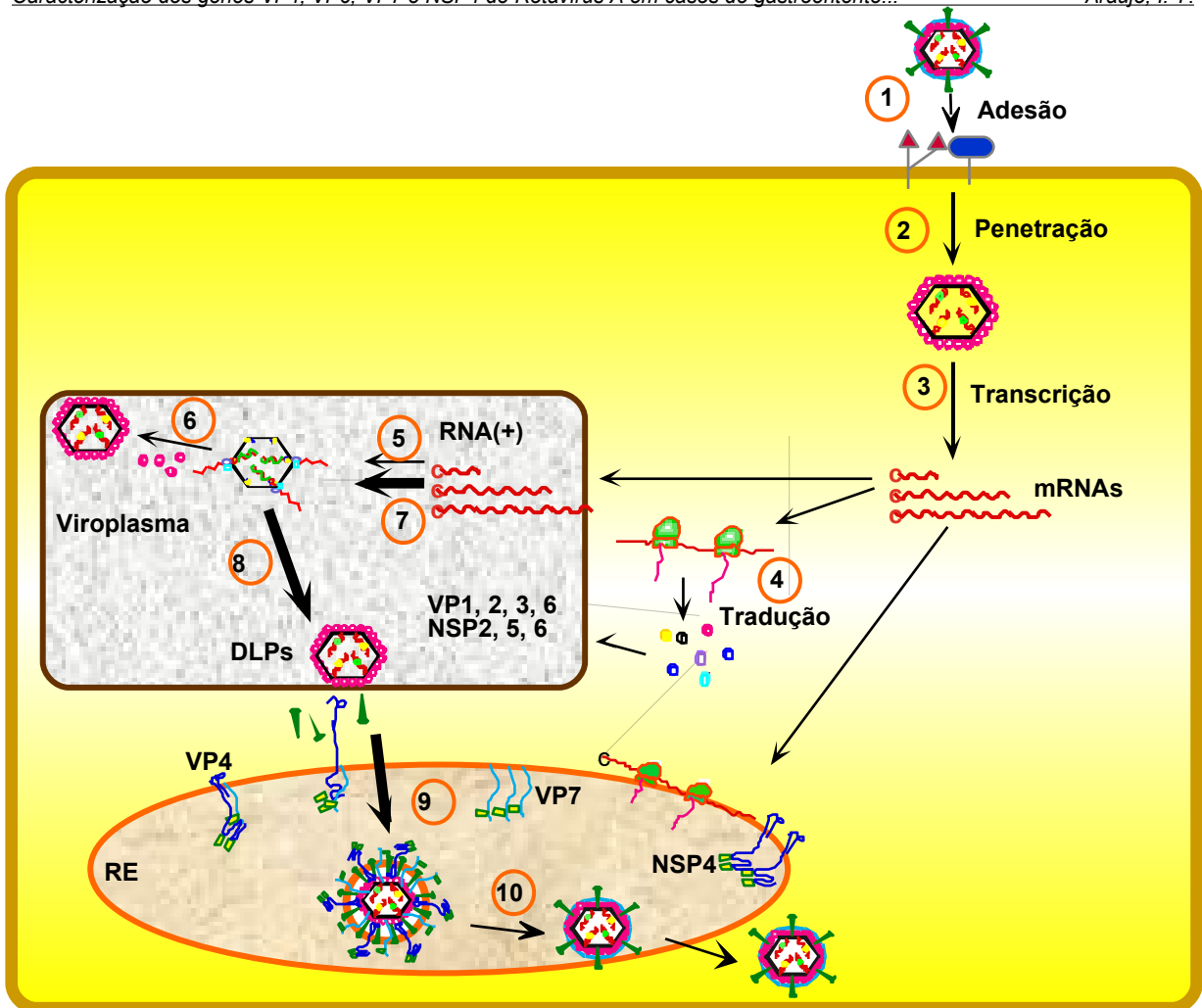


Figura 9. Modelo esquemático do ciclo de replicação dos rotavírus. As etapas de replicação estão indicadas nos números: 1. Adesão do vírus à superfície celular; 2. Penetração e liberação da partícula viral produzindo DLPs; 3. Transcrição primária do dsRNA genômico; 4. Síntese das proteínas virais; 5. Síntese primária de fitas negativas de RNA; 6. Montagem da partícula viral; 7. Síntese secundária de fitas negativas de RNA; 8. Montagem das DLPs; 9. Brotamento da DLP na membrana do RE; 10. Perda do envoltório transitório e geração de vírions maduros com triplo capsídeo (Adaptada de Arias *et al.*, 2004).

1.1.5. Diagnóstico laboratorial

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

Os rotavírus são excretados em altíssimas concentrações durante a fase aguda da doença. Por isso, é necessário que a coleta do espécime fecal ocorra nos primeiros 2 a 5 dias do início dos sintomas, facilitando sobremaneira sua detecção.

Um dos métodos mais utilizados é o ensaio imunoenzimático, visando a utilização de anticorpos policlonais ou monoclonais para detecção da proteína VP6, constituinte básico do capsídeo intermediário comum a inúmeras amostras virais do grupo A de rotavírus (Flewett *et al.*, 1989). Um *kit* imunoenzimático foi desenvolvido na Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) pelo Departamento de Virologia (IOC) em parceria com Biomanguinhos, o EIARA (*Enzyme ImmunoAssay for Rotavirus and Adenovirus*), que permite a detecção de antígenos de rotavírus e adenovírus a partir de suspensões fecais e que obteve grande valor em termos epidemiológicos nacionais (Pereira *et al.*, 1985). Outro procedimento difundido e recomendado para uso em hospitais e clínicas pediátricas é o teste do látex. Representa um teste de rápida detecção de rotavírus em amostras fecais através da aglutinação de microesferas de látex sensibilizadas com anticorpos. É de sensibilidade comparável à do ELISA, porém com vantagem de execução em até 20 minutos (Brandt *et al.*, 1987).

Outras metodologias vêm sendo descritas e mais empregadas na investigação científica, como os métodos moleculares que partem da extração do ácido nucléico para a análise do mesmo.

A eletroforese do RNA viral em gel de poliacrilamida (EGPA) representa um método diagnóstico com sensibilidade e especificidade altas, possibilitando a caracterização dos perfis genômicos de rotavírus, entre eles os dos rotavírus atípicos (grupos B-G) (Pereira *et al.*, 1983).

A reação em cadeia pela polimerase, precedida de transcrição reversa (RT-PCR) tem sua aplicação na detecção e genotipagem dos rotavírus em amostras fecais. Esta técnica também representa um método de alta sensibilidade e

especificidade. Através de iniciadores de cadeia consensuais e específicos é feita uma amplificação enzimática dos genes de VP4 (genotipo P) e VP7 (genotipo G) (Gentsch *et al.*, 1992; Das *et al.*, 1994; Gouvea *et al.*, 1994a). Uma variação desta técnica, a RT-PCR em tempo real, permite quantificar a carga viral durante um episódio de infecção e investigar sua relevância quanto aos sintomas clínicos da doença. Em estudo realizado na Índia, este procedimento foi utilizado para estimar a carga de rotavírus e correlacionar com o *score* de Vesikari de gravidade da diarreia. Houve uma correlação negativa entre a gravidade da doença e o ciclo do PCR onde os amplicons eram detectados (*crossing point*), indicando que crianças com diarreia mais grave excretam maior quantidade de vírus do que crianças com diarreia de menor gravidade (Kang *et al.*, 2004).

O seqüenciamento genômico permite a aquisição de informações sobre os mecanismos pelos quais os rotavírus evoluem e se diversificam. Sabe-se que 2 mecanismos estão envolvidos: o acúmulo de mutações pontuais, que gera novas linhagens genéticas; e a reestruturação ou *reassortment* durante uma infecção mista, que favorece a diversidade de genótipos infectando humanos.

A filogenética molecular converte as informações contidas nas seqüências de nucleotídeos em árvores evolutivas representativas. Nesse método de análise é possível fazer um estudo de diversidade intragenótipo, com a subdivisão dos genótipos em linhagens ou sub-linhagens, diferenciadas geneticamente (Parra *et al.*, 2004). Em menor escala, este método pode ser empregado para caracterizar amostras onde a genotipagem pela RT-PCR foi ineficiente (Fischer & Gentsch, 2004).

1.1.6. Epidemiologia

As infecções por rotavírus são muito comuns e tem se descrito que até a idade de 5 anos 95% das crianças já tenham sido infectadas. Os índices mais

elevados das enfermidades por rotavírus ocorrem dos 6 aos 24 meses de idade, sendo esta faixa etária a que mais corre o risco de sofrer diarreia aguda com desidratação e que freqüentemente leva à hospitalização. A infecção em adultos apresenta-se muitas vezes na forma assintomática, podendo ocorrer ocasionalmente sintomas em pais de crianças infectadas, em imunocomprometidos e em adultos da terceira idade (Estes, 2001; Parashar *et al.*, 2003). Deve-se ainda ser enfatizada a transmissão nosocomial, onde 1 em cada 60 crianças hospitalizadas por doença não-diarreica desenvolve diarreia associada à infecção por rotavírus (Kapikian *et al.*, 2001). No Brasil, dados mostram que até 40% dos casos de diarreia em hospitais de pediatria de Belém estão relacionados com infecções por rotavírus (Gusmão *et al.*, 1995).

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

A sintomatologia clínica das infecções por rotavírus traduz-se por uma diarreia aguda (mais de 8 evacuações ao dia) acompanhada de vômito e ocasionalmente febre. Caracteriza-se por ser uma doença autolimitada, com duração média de 5 dias. A perda de fluidos e eletrólitos devido ao vômito e diarreia pode levar a uma desidratação grave, hospitalização e morte, especialmente em bebês e crianças subnutridas (Wickelgren, 2000). O efeito deletério viral é de natureza lítica, onde as células epiteliais imaturas que reconstituem o tecido possuem níveis reduzidos de dissacaridases, incluindo lactase, e os transportes de sódio e glicose são prejudicados. Como consequência, observa-se um quadro diarreico de natureza osmótica, havendo, em geral, a necessidade de tratamento que consiste primariamente da reposição de fluido e eletrólitos tanto pela via oral quanto endovenosa (Pérez-Vargas *et al.*, 2006).

As manifestações clínicas nas infecções por rotavírus não são suficientemente características para permitir um diagnóstico seguro, por isso a necessidade da detecção direta do vírus ou de antígenos virais. Durante a infecção são excretadas inúmeras partículas virais durante os episódios diarreicos, o que facilita sua detecção através de imunoenaios, eletroforese do dsRNA viral ou detecção do genoma através de técnicas moleculares.

Os genótipos G e P de rotavírus são codificados por segmentos distintos do dsRNA. Esta característica permite a ocorrência de uma variedade de combinações dos genes VP7 e VP4 observada em isolados *in natura*.

Os estudos epidemiológicos realizados mostram que diversos genótipos P e G podem co-circular dentro de uma mesma região e que o genótipo prevalente em uma determinada região pode mudar anualmente. Outra observação é que os genótipos prevalentes em diferentes regiões de um país podem ser distintos durante o mesmo período epidêmico (Pérez-Vargas *et al.*, 2006).

1.1.6.1. Genótipos Usuais de Rotavírus

Muitos estudos epidemiológicos descrevem a distribuição e prevalência de diferentes genótipos em todo mundo e entre eles podem-se destacar 4 genótipos G (G1, G2, G3 e G4) e 2 genótipos P (P[4] e P[8]) como os mais freqüentes detectados mundialmente (Hoshino & Kapikian, 2000; Gentsch *et al.*, 2005). Santos & Hoshino (2005), em uma extensa revisão dos genótipos circulantes no mundo demonstraram que as quatro maiores combinações P[8]G1, P[4]G2, P[8]G3 e P[8]G4 representaram mais de 90% das infecções por rotavírus na América do Norte, Europa e Austrália. Contudo, na América do Sul e Ásia, elas representaram somente 68%, e na África, 50%. A combinação P[8]G1 ocorreu em mais de 70% das infecções na América do Norte, Europa e Austrália, e em 30% e 23% das infecções na América do Sul e na África, respectivamente (**Figura 10**).

A exemplo do que ocorre no mundo, no Brasil essas combinações também tem sido registradas com prevalências que variam de acordo com o ano e o local da amostra isolada. No Rio de Janeiro, Leite e colaboradores (1996) em estudo com amostras brasileiras detectaram os genótipos P[8]G1, P[4]G2, P[8]G3 e P[8]G4 em 67% dos casos. Por outro lado, Araújo e colaboradores (2002) também identificaram combinações usuais tais como P[4]G2 em 21%, P[8]G1 em 17% e P[8]G3 em 13% dos casos. Em Belém, Pará, ficou evidente a ocorrência dos genótipos P[8]G1 e P[4]G2 em 53% e 27% dos casos, respectivamente, em amostras provenientes de crianças que receberam a vacina tetravalente RRV-TV (Mascarenhas *et al.*, 2002).

primeira vez por Gouvea *et al.*, (1994b) entre crianças com diarreia e posteriormente detectados em casos de diarreia infantil em diferentes ocasiões (Leite *et al.*, 1996; Timenetsky *et al.*, 1997; Santos *et al.*, 1999; Araújo *et al.*, 2002; Carmona *et al.*, 2004). No Brasil esse genotipo também tem sido registrado infectando suínos (Racz *et al.*, 2000; Barreiros *et al.*, 2003).

G9. O genotipo G9 foi encontrado inicialmente nos Estados Unidos (Clark *et al.*, 1987) e atualmente está amplamente distribuído mundialmente. Inicialmente este genotipo era considerado não-usual, porém devido à circulação de G9 em vários países, foi sugerido que este genotipo seja considerado usual, encontrando-se como o quinto genotipo G circulante a nível mundial (Santos & Hoshino, 2005). Diversos relatos recentes de infecções por rotavírus associadas ao genotipo G9 vêm sendo descritos em diferentes países como Itália (Arista *et al.*, 1997), Índia (Unicomb *et al.*, 1999), Malawi (Cunliffe *et al.*, 1999), Estados Unidos (Griffin *et al.*, 2000), Inglaterra (Cubitt *et al.*, 2000), França (Bon *et al.*, 2000), Argentina (Bok *et al.*, 2001), Austrália (Wilhelmi *et al.*, 2003), Eslovênia (Steyer *et al.*, 2005) e Irlanda (Reidy *et al.*, 2005). No Brasil, os primeiros relatos da emergência de G9 associado a casos de diarreia infantil estão distribuídos em diferentes regiões como no Rio de Janeiro (Araújo *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2001), Belém (Mascarenhas *et al.*, 2002), Juiz de Fora (Rosa e Silva *et al.*, 2002), Goiânia (Souza *et al.*, 2003), Salvador (Santos *et al.*, 2005) e São Paulo (Carmona *et al.*, 2006).

1.1.6.3. Distribuição dos Genotipos de NSP4 de Rotavírus

Estudos de análise genética e distribuição dos genotipos de NSP4 são escassos e não muito frequentes, porém sabe-se que pelo menos 3 genotipos têm sido descritos em humanos, sendo eles NSP4A-KUN, NSP4B-Wa e NSP4C-AU1.

Nos Estados Unidos, 39 seqüências de NSP4 foram obtidas entre 1996-1997 de diferentes genotipos (P[8]G1, P[8]G9, P[4]G2 e P[6]G9). A análise da NSP4 revelou que todas as amostras de eletroferotipo longo (P[8]G1 e P[8]G9)

pertenciam ao genótipo NSP4B-Wa e todas as amostras de eletroferotipo curto (P[4]G2 e P[6]G9) pertenciam ao genótipo NSP4A-KUN (Kirkwood *et al.*, 1999).

Dois estudos de vigilância realizados no Japão (Sapporo, Tóquio e Saga) e na Tailândia de 1995 até 2000, descrevem a prevalência do genótipo G9 associado a casos de crianças hospitalizadas com diarreia. A análise dos genes de NSP4 mostrou a distribuição de 2 genótipos, NSP4A-KUN e NSP4B-Wa. Amostras P[8]G9 pertenciam ao genótipo NSP4B-Wa e amostras P[6]G9 e P[4]G9 pertenciam ao genótipo NSP4A-KUN (Zhou *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2003).

Uma análise computacional detalhada selecionou 176 seqüências de NSP4 que estão depositadas no banco de genes e como resultado agrupou tais amostras nos genótipos NSP4A-KUN, NSP4B-Wa e NSP4C-AU1 de rotavírus (Lin & Tian, 2003).

No Brasil, estudos iniciais da proteína NSP4 foram realizados por Mascarenhas *et al.* (2006) em amostras fecais de neonatos hospitalizados apresentando diarreia adquirida na comunidade, diarreia nosocomial e infecção nosocomial assintomática na cidade de Belém, Pará. As amostras foram caracterizadas como genótipo P[6]G2 e todas pertencendo ao genótipo NSP4A-KUN. Ainda no Brasil, Araújo *et al.* (2006) descreve a análise do gene da NSP4 em 30 amostras fecais de crianças hospitalizadas na cidade do Rio de Janeiro. As amostras envolvidas neste estudo foram caracterizadas como P[8]G9, P[8]G1, P[4]G9 e P[4]G2. Semelhante aos trabalhos descritos anteriormente, amostras P[4]G2 agruparam-se com protótipos do genótipo NSP4A-KUN e amostras P[8]G9, P[8]G1 e P[4]G9 agruparam-se com protótipos do genótipo NSP4B-Wa.

1.1.7. Imunidade

Os mediadores do sistema imune que estão correlacionados com a proteção nas infecções por rotavírus ainda não são conhecidos por completo. Sabe-se que as duas proteínas de capsídeo externo, VP4 e VP7, são capazes de conferir imunidade protetora por estímulo da produção de anticorpos neutralizantes (Chiba *et al.*, 1986; O'Ryan *et al.*, 1994). Muitas evidências sugerem também que as proteínas virais que não possuem a capacidade de estimular a produção de anticorpos neutralizantes são potencialmente capazes de induzir uma resposta imune protetora. Ainda existem

controvérsias sobre os mediadores determinantes da proteção, embora haja indicadores convincentes do papel exercido pelos anticorpos sistêmicos e locais produzidos na mucosa intestinal, além da imunidade mediada por células, visando a resolução do quadro diarréico (Kapikian *et al.*, 2001). Estudos mostram que a infecção natural por rotavírus confere proteção contra doença subsequente, daí o fato do primeiro episódio normalmente se revestir de maior gravidade clínica (Velazquez *et al.*, 1996).

Acredita-se que durante a infecção por rotavírus o mais importante isotipo de imunoglobulina presente seja IgA, já que esta infecção encontra-se geralmente restrita às células das vilosidades do intestino delgado. Muitos estudos já relataram nas infecções por rotavírus, respostas imunes relacionadas com a produção de IgA específica para rotavírus *in vivo* em humanos, suínos e camundongos (Matson *et al.*, 1993; Feng *et al.*, 1994; Ward, 1996; Yuan *et al.*, 1996). A imunidade protetora parece estar relacionada com os níveis de IgA no soro e intestino (Bishop *et al.*, 1996), e na ausência ou em níveis limitados de IgA, outras moléculas de anticorpo efetoras presentes no intestino podem prover proteção. Nas infecções por rotavírus, são ainda produzidos anticorpos das classes IgM e IgG no soro ou no intestino (Offit, 1994).

A resposta imune na infecção viral pode ser tanto homotípica, isto é, sorotipo-específica, quanto heterotípica. A infecção heterotípica por um determinado sorotipo se acompanha da produção de anticorpos também contra outros, com resposta imune heteróloga (Ward, 1996).

Há evidências crescentes quanto à importância que exerce a imunidade mediada por células, em particular quanto à eliminação dos vírions infectantes na mucosa intestinal (Offit, 1996). Tal processo de resolução viral envolve principalmente os linfócitos citotóxicos T (CD8+ e CD4+) do trato gastrointestinal. Em princípio, os linfócitos B assumiriam importância frente à infecção por rotavírus associando-se à produção de anticorpos específicos das classes IgA e IgG, enquanto os linfócitos T determinariam a resolução do processo infeccioso propriamente dito (Ward, 1996).

Os anticorpos maternos adquiridos passivamente via transplacentária ou pelo aleitamento materno, parecem justificar os quadros de infecção assintomática em geral observados entre crianças com idades inferiores a três meses (Kapikian *et al.*, 2001). Além das imunoglobulinas específicas de origem materna, sustenta-se que

fatores não imunes, como algumas glicoproteínas, concorram com o potencial protetor atribuído ao leite humano (Newburg *et al.*, 1998).

1.1.8. Vacinas

Devido ao impacto mundial causado pelas infecções por rotavírus entre crianças em todo o mundo, várias vacinas candidatas têm sido desenvolvidas ou estão em desenvolvimento. Os métodos de desenvolvimento de vacinas empreendidos com a utilização de vírus de origem animal foram denominados *Jennerianos*, baseados na estratégia pioneira do cientista inglês Edward Jenner. Outros métodos também vêm sendo empreendidos, como as estratégias de vacinas construídas de amostras geneticamente rearranjadas envolvendo segmentos genômicos de origens humana e animal. Em geral, nesse tipo de vacina, preserva-se o gene associado à proteína viral VP7, de origem humana. Os 10 genes adicionais advêm de rotavírus bovinos ou símios, garantindo-se o potencial de replicação da amostra em cultura de tecidos.

1.1.8.1. Estratégia Jenneriana Monovalente

Alguns estudos demonstraram que os rotavírus animais e humanos compartilham um grupo comum de antígenos e que animais imunizados experimentalmente com rotavírus animais tiveram baixo risco de infecção aos rotavírus humanos. A neutralização de anticorpos para os sorotipos de rotavírus humanos em modelos animais mostram uma proteção cruzada em potencial (Parashar *et al.*, 1998). São descritas abaixo as vacinas já estudadas:

RIT 4237. Derivada do isolamento de rotavírus bovino NCDV de genotipo P[1]G6. Apresentou eficácia na Finlândia, cobrindo até 80-90% de proteção contra casos graves de diarreia por rotavírus (Vesikasri *et al.*, 1985). Contudo, na África a eficácia dessa vacina, após 3 doses, foi de 33% (Hanlon *et al.*, 1987). A fabricação dessa vacina foi descontinuada devido à sua imunogenicidade e eficácia insuficientes.

WC3. Isolada de fezes diarreicas de bezerro recém-nascido, genotipo P[2]G6. Em um ensaio conduzido na Filadélfia, após uma única dose, induziu 76% de proteção total (Clark *et al.*, 1988). Contudo, em avaliações posteriores em Ohio,

Estados Unidos (EUA), a vacina mostrou somente 20% de eficácia. Também foi descontinuada a produção e aplicação dessa vacina.

RRV ou MMU18006. De origem símia, foi isolada de fezes de macaco *Rhesus sp* com diarreia aguda, pertencente ao sorotipo G3. Provou ser imunogênica, porém foi associada a reação febril importante (Vesikari *et al.*, 1986).

1.1.8.2. Estratégia Jenneriana Modificada

Envolve o co-cultivo de rotavírus de origens humana e animal, com posterior seleção por anticorpos monoclonais (Linhares & Bresee, 2000). Inicialmente construíram-se vacinas com especificidade antigênica monotípica, ou seja, amostras com 10 genes de origem bovina ou símia e um gene (segmento 9) de origem humana (G1 ou G2). A eficácia foi restrita aos países desenvolvidos, particularmente o genotipo circulante homólogo ao da vacina em potencial (Pérez-Schael *et al.*, 1999). A idéia de que a proteção conferida por uma vacina assume caráter “sorotipo-dependente”, tornou possível a formulação de uma vacina tetravalente, com amostras geneticamente reestruturadas com especificidades antigênicas para os sorotipos G1, G2, G3 e G4 (Kapikian *et al.*, 2001; Linhares & Bresee, 2000).

RRV-TV (Rotashield™). Derivada de co-infecção em culturas celulares de amostras de rotavírus símio (MMU18006, sorotipo G3) e de rotavírus humano (D, sorotipo G1; DS-1, sorotipo G2 e ST-3, sorotipo G4). A eficácia da vacina geneticamente modificada de rotavírus (RRV-TV) foi avaliada em estudos com crianças em vários países. Nos EUA essa vacina ofereceu níveis protetores de até 80%, reduzindo significativamente a incidência de diarreia por rotavírus (Bernstein *et al.*, 1995). Em países, como Peru e Brasil, a eficácia se revelou apenas parcial, com indicadores de proteção variando de 24% a 35% (Linhares *et al.*, 1999). Quando analisados os dados da Finlândia, EUA e Venezuela, aproximadamente 50% de proteção foi observada em todos os episódios diarreicos e 80-100% nos episódios mais graves (Rennels *et al.*, 1996; Joensuu *et al.*, 1997; Pérez-Schael *et al.*, 1997).

Esta vacina foi desenvolvida e fabricada sob a designação comercial de Rotashield™ (Wyeth Laboratories Inc., Marietta, PA) e depois de uma extensiva avaliação em diferentes populações, foi licenciada em 1998 pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para uso clínico nos EUA. Entretanto, em julho de 1999, após a

administração de quase 1.500 mil doses, foi suspensa a aplicação da Rotashield™ por estar associada a 15 casos de intussuscepção (obstrução intestinal) envolvendo crianças que haviam tomado a vacina (CDC/MMWR, 1999; Hoshino *et al.*, 2003). Após este fato, diversos estudos epidemiológicos foram conduzidos capazes de caracterizar os riscos quanto ao desenvolvimento de intussuscepção, principalmente nas duas semanas após a primeira e segunda doses. Os riscos estimados são da ordem de 1 evento obstrutivo intestinal para cada 4.500 crianças vacinadas (Murphy *et al.*, 2001); o risco assumia maiores proporções quando a vacina era administrada em idade superiores a 90 dias, quando comparadas a crianças imunizadas aos 2 meses (Fischer *et al.*, 2004). Além da intussuscepção, evidências indicam que a vacina foi indutora de outros eventos adversos importantes, como a diarreia sanguinolenta (Haber *et al.*, 2004).

Rotateq™. Outra candidata à vacina polivalente construída a partir do protótipo viral WC3, de origem bovina. A WC3 é uma preparação tetravalente reunindo amostras virais com especificidades antigênicas para G1, G2, G3 e P1A[8]. Estudos conduzidos nos EUA mostraram eficácia da WC3 de até 100% nos episódios diarréicos mais graves (Clark *et al.*, 2004). Essa preparação estabeleceu a base para obtenção de um imunizante antigênico mais amplo, incluindo G4 ao conjunto tetravalente original. Assim, esse imunizante pentavalente, recombinante bovino-humano foi designado Rotateq™ (Merck Research Laboratories, West Point, PA) e resultou em proteção de até 100% nos casos de diarreia por rotavírus com maior gravidade (Heaton, 2005).

1.1.8.3. Vacina de origem Humana

Rotarix™ (RIX4414). É uma vacina atenuada para manter a capacidade imunogênica, porém não patogênica. Foi elaborada com rotavírus isolados de fezes de um bebê de 15 meses em Cincinnati (Ohio, EUA). A vacina é monovalente, ou seja, a cepa utilizada possui apenas um sorotipo em sua composição que é o G1[P8] da cepa RIX4414 (Glass *et al.*, 2004).

A eficácia foi avaliada em três estudos, um na Finlândia (Vesiakri *et al.*, 2004), outro no México, Venezuela e Brasil (Salinas *et al.*, 2005), e um terceiro que envolveu dez países da América Latina e a Finlândia (Ruiz-Palacios *et al.*, 2006). Considerando duas doses da vacina, sua eficácia para episódios de diarreia grave

causada por rotavírus variou entre 68,5 e 90,0%. Para diarreia de qualquer gravidade, a eficácia variou entre 55,7 e 73,0%. Para hospitalizações devido à doença causada por rotavírus, a eficácia protetora variou entre 65,4 e 93,0%. A eficácia na redução de hospitalizações de uma forma geral foi de 42% (Ruiz-Palacios *et al.*, 2006). Os dados da América Latina (Brasil, México e Venezuela) mostraram uma eficácia protetora contra gastroenterite por rotavírus, gastroenterite grave por rotavírus e hospitalizações devido à gastroenterite por rotavírus de 62,9%, 78,3% e 86,0%, respectivamente. Já a partir da primeira dose, a vacina mostrou eficácia na prevenção de doença por rotavírus. Para gastroenterite grave por rotavírus, a eficácia foi de 73% e para gastroenterite em geral foi de 63,5% (Salinas *et al.*, 2005). A vacina é especialmente eficaz na prevenção de doença por rotavírus do genótipo G1, mas os estudos mostram que houve proteção cruzada para gastroenterite e gastroenterite grave causada por outros genótipos (G2, G3, G4 e G9). Esta eficácia variou entre 65% e 100% (Ruiz-Palacios *et al.*, 2006).

No Brasil, o avanço nas ações de saúde pública para a população de todo o país introduziu a Rotarix™ no calendário básico de imunizações para crianças. Esta nova vacina, implantada no Brasil a partir de março de 2006, é dirigida à população de menores de seis meses de idade para proteger antecipadamente as crianças da faixa etária de 6 a 24 meses, nas quais se observa a maior carga de complicações decorrentes da infecção pelo rotavírus. A nova vacina foi licenciada no mercado internacional em julho de 2004 e no Brasil foi licenciada pela ANVISA em julho de 2005 (DEVEP/SVS/MS, 2005).

1.1.9. Aspectos de Relevância nas infecções por Rotavírus

As gastroenterites infecciosas representam a causa mais comum de mortalidade e morbidade em crianças menores de 5 anos, principalmente nos países em desenvolvimento. Considerando os principais agentes envolvidos na etiologia das gastroenterites, como bactérias, vírus e outros parasitas, pode-se ressaltar um expressivo número de episódios de etiologia viral. Dentre os diferentes vírus implicados na etiologia das diarreias, podem-se destacar os rotavírus, adenovírus entéricos, astrovírus e calicivírus humanos (*norovírus e sapovírus*) (Kapikian *et al.*, 2001). Os rotavírus do grupo A representam a principal etiologia associada a diarreia aguda em crianças menores de 5 anos, causando elevada morbidade em países

desenvolvidos, assim como morbi-mortalidade nos países em desenvolvimento (Parashar *et al.*, 2006).

Em todo mundo as gastroenterites infantis agudas causadas por rotavírus estão associadas com cerca de 611.000 mortes ao ano, 80% dessas mortes ocorrendo em países subdesenvolvidos, principalmente na Ásia e África (Parashar *et al.*, 2006). Na União Européia foi estimado que 3,6 milhões de episódios de diarreia por rotavírus ocorram anualmente entre as 23,6 milhões de crianças menores de 5 anos de idade. A cada ano, as infecções por rotavírus são responsáveis por aproximadamente 231 óbitos, 87.000 hospitalizações e 700.000 consultas médicas na Europa (Soriano-Gabarró *et al.*, 2006). No Brasil, os dados obtidos nos mostram a prevalência de rotavírus variando de 13% a 20% em diferentes Estados. A sazonalidade é distinta com o aumento das infecções nos meses mais secos e com temperatura mais amena; entre maio e setembro nas regiões Sul e Sudeste e entre setembro e novembro na região Centro-Oeste. Nas regiões Norte e Nordeste a sazonalidade não é definida (Instituto Adolfo Lutz e Centro de Vigilância Epidemiológica “Professor Alexandre Vranjac”, 2004).

Enquanto os índices de mortalidade infantil devido às infecções por rotavírus são maiores nos países em desenvolvimento, a frequência das infecções é muito similar em ambos os países desenvolvidos e em desenvolvimento. As melhorias nas condições de higiene e saneamento básico aparentemente não são suficientes para controlar significativamente as infecções por esses vírus, por isso o interesse do desenvolvimento e aplicação de uma vacina eficaz para minimizar a gravidade da diarreia causada por rotavírus (Pérez-Vargas *et al.*, 2006).

O impacto global representado pelos indicadores de morbidade e mortalidade por gastroenterite aguda na infância, revela que os rotavírus subsistem como um importante desafio na Saúde Pública, particularmente nas regiões menos desenvolvidas.

A caracterização molecular dos rotavírus tem permitido a identificação de uma diversidade de genótipos VP4 e VP7, além da emergência de genótipos não-usuais circulando em todo o mundo. Através do sequenciamento dos genes que codificam VP4 e VP7 e análise filogenética, foram descritas linhagens e sub-linhagens em diferentes populações estudadas. Os dados deste tipo de análise são importantes a fim de rastrear as diferenças antigênicas das variantes de rotavírus detectadas

antes, durante ou depois do período de vacinação no Brasil, mesmo porque nos estudos com as vacinas candidatas não foi verificada este tipo de abordagem.

O estudo da proteína VP6 determina em bases moleculares os SGs do grupo A de rotavírus com espécie-especificidade. Este tipo de análise molecular permite investigar o envolvimento da VP6 no mecanismo de *reassortment* e a variabilidade do gene da VP6 entre os diferentes SGs.

No Brasil não existem relatos sobre o potencial enterotóxico da proteína NSP4 relacionando-a, principalmente, com a virulência. Dentre os genótipos G e P de rotavírus comuns ou resultantes de *reassortments*, pode-se determinar a variabilidade da NSP4 entre as amostras de rotavírus circulantes em uma área geográfica. Na literatura há relatos conflitantes quanto a correlação dos genótipos de NSP4 com casos de diarreia grave até os assintomáticos, a fim de verificar se esta proteína está ou não relacionada com virulência dos isolados virais (Ball *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2000; Mascarenhas *et al.*, 2006).

Este estudo original foi realizado com amostras anteriores à introdução da vacina anti-rotavírus (Rotarix™) e pode servir de base para os estudos de vigilância epidemiológica e laboratorial que estão em curso no Brasil para avaliar o impacto da vacinação na população infantil.

II. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

- Caracterizar em bases moleculares os genes das proteínas VP4, VP7, VP6 e NSP4 de rotavírus em amostras fecais de crianças hospitalizadas com gastroenterite aguda na cidade do Rio de Janeiro, no período de 1986 a 2004.

2.2. Objetivos Específicos

Através do seqüenciamento e análise filogenética determinar:

- Os genótipos de NSP4 de rotavírus (NSP4A-KUN e NSP4B-Wa);
- Os subgrupos de VP6 de rotavírus (SGI, SGII, SGI+II, SGNãoI-nãoII);
- As linhagens e sublinhagens nos genótipos de VP4 (P) e VP7 (G) identificados nas amostras de rotavírus.

III. DISCUSSÃO

Os rotavírus representam a principal causa de diarreia com desidratação em crianças e a prevenção através da vacinação pode ser uma medida efetiva para o controle das formas graves da doença. Para isso, investigações sobre a distribuição e prevalência dos genótipos de rotavírus tem sido conduzidas em programas de vigilância epidemiológica em diferentes países do mundo (Gentsch *et al.*, 1996; Jin *et al.*, 1996; Griffin *et al.*, 2000; O`Ryan *et al.*, 2001; Bresee *et al.*, 2004; Kane *et al.*, 2004; Santos & Hoshino, 2005). Devido a gravidade da diarreia e desidratação provocada pela doença, os rotavírus causam aproximadamente 2 milhões de hospitalizações a nível mundial (Parashar *et al.*, 2006). No Brasil é reportada maior prevalência da infecção por rotavírus em pacientes hospitalizados, variando de 13% a 20% em diferentes estados (Pereira *et al.*, 1993). Na cidade do Rio de Janeiro, Carvalho-Costa e colaboradores (2006) detectaram rotavírus em 48% das crianças hospitalizadas com gastroenterite aguda. Esses dados ressaltam a importância do estudo molecular dos genes envolvidos com a proteção e imunidade nas infecções por rotavírus. O monitoramento dos genótipos que estão infectando a população

possibilita avaliar a eficácia de uma vacina que diminuirá a morbidade e os custos associados com atendimento médico e hospitalizações.

3.1. Análise Molecular dos genes VP4 e VP7 (Anexos 1, 2 e 4)

A diversidade intragenotipo dos rotavírus tem sido relatada em diferentes trabalhos. Tais investigações possibilitam determinar a variação genética e antigênica dos rotavírus através da classificação de linhagens e sublinhagens dentro dos genotipos (Wen *et al.*, 1995; Gouvea *et al.*, 1999; Bok *et al.*, 2002; Laird *et al.*, 2003; Martella *et al.*, 2005). Dessa forma, é possível obter um perfil das amostras de rotavírus circulantes e assim avaliar quais podem potencialmente alterar a eficácia de uma vacina em uso.

Em nosso estudo, os dendogramas foram construídas a partir do seqüenciamento e análise dos genes VP4 e VP7 dos genotipos P[8]G1, P[8]G5, P[8]G9 e P[4]G2. Os isolados P[8]G1 analisados mostraram sete deles agrupando dentro das linhagens G1-3 e P[8]-3 e um agrupando de forma distinta dentro das linhagens G1-4 e P[8]-2 (Anexo 3). De maneira semelhante, um estudo com rotavírus P[8]G1 na Finlândia descreve que as amostras analisadas filogeneticamente pertenciam às linhagens G1-1 e G1-2, todas associadas à linhagem P[8]-1. Amostras pertencentes à linhagem G1-3 também foram descritas, porém associadas à linhagem P[8]-2 (Maunula & von Bonsdorff, 1998). Estes dados sugerem que as linhagens de P[8]G1 de rotavírus apresentam diferenças temporais e geográficas.

Uma investigação realizada em 173 seqüências de rotavírus G1 coletadas no GenBank do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) mostrou que a maior parte agrupou dentro das linhagens G1-1, G1-2 e G1-3, com exceção da amostra brasileira Brz2 que agrupou dentro da linhagem G1-4 (Parra & Espinola, 2006). No presente trabalho, a amostra rj31022/86 agrupou juntamente com a amostra Brz2 na linhagem G1-4. Brz2 é uma amostra de rotavírus recuperada de uma criança vacinada com RRV-TV em Belém, Pará (Jin *et al.*, 1996) e nossa análise mostra esses dois isolados muito relacionadas entre si. É interessante mencionar que a Brz2 representa uma amostra isolada no Norte do país e a rj31022/86 uma amostra isolada no Sudeste do país, aproximadamente 3.000Km de distância. As amostras mais recentes (2001-2004) agruparam separadamente,

revelando uma considerável distância com as amostras Brz2 e rj31022/86 (Anexo 1, fig 1a).

Até o presente momento foram descritas quatro linhagens dentro do genotipo G1 (Jin *et al.*, 1996; Parra & Espinola, 2006), o que torna importante a contínua caracterização intragenotípica de amostras G1 isoladas no Brasil. A vacina RIX4414 (Rotarix™, GlaxoSmithKline Biologicals) com especificidade P[8]G1 foi implementada no Brasil em março deste ano. Portanto, estes dados anteriores à introdução da vacina são importantes para evidenciar possíveis diferenças antigênicas da proteína VP7, que resulta em uma diversidade que pode vir a ser um desafio na eficácia da vacina.

Nossa análise do gene VP7 das amostras de genotipo G2 seguiu a classificação feita por Page e Steele (2204a; 2004b) em amostras G2 isoladas na África. Os isolados africanos coletados entre 1996 até 2000 agruparam na linhagem G2-2, a qual foi posteriormente separada em quatro sublinhagens: G2-2a, G2-2b, G2-2c e G2-2d (Page & Steele, 2004b). Contrariamente ao descrito pelos autores, as amostras G2 rj5323/02 e rj5619/02 do Rio de Janeiro agruparam com os protótipos DS-1 (isolado em 1976) e SA514GR (isolado em 1987) considerados pelos autores como amostras “antigas”. No estudo desenvolvido em Belém, Pará, todas as amostras P[6]G2 analisadas formaram um cluster junto com as linhagens “novas” G2-2b, G2-2c e G2-2d (Mascarenhas *et al.*, 2006). É interessante notar que as amostras de Belém datam de 1997, sendo mais “antigas” do que as de genotipo G2 descritas em nosso estudo que datam de 2002.

O gene VP7 das amostras G5 isoladas em nosso estudo foram analisadas e agruparam com as amostras G5 brasileiras BrH8 e Br1054 (Alfieri *et al.*, 1996), formando um grupo separado dos isolados de origem suína OSU e JL94. Os rotavírus de genotipo G5 estão circulando em nossa população e infectando humanos no Brasil por pelo menos 23 anos, de acordo com dados publicados por Gouvea *et al.* (1994b). As amostras G5 isoladas em nosso estudo (rj35400/87 e rj40644/90) foram coletadas em casos de diarreia infantil nos anos de 1987 e 1990, corroborando com a descrição da distribuição temporal deste genotipo no Brasil (Leite *et al.*, 1996).

As dezessete amostras de rotavírus G9 em nosso estudo foram analisadas e agruparam dentro da linhagem G9-3, muito próximas aos isolados R44 e 1527 previamente descritos no Rio de Janeiro (Araújo *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2001).

Em estudo conduzido na cidade de Salvador, Bahia, Santos *et al.* (2005) descreveram isolados de genotipo G9 também pertencentes à linhagem G9-3. Como já evidenciado em estudos de epidemiologia molecular em diferentes países, a maioria dos isolados G9 de rotavírus pertencem à linhagem G9-3 (Bányai *et al.*, 2004; Rubilar-Abreu *et al.*, 2005; Khamrin *et al.*, 2006). Uma característica genética observada em todas as análises do gene VP7 de isolados G9 de rotavírus, é a distância das amostras analisadas com os protótipos P[8]G9 originalmente isolados na década de 80, como 116E (Índia), F45 (Japão) e W161 (Estados Unidos) (Clark *et al.*, 1987; Green *et al.*, 1989; Das *et al.*, 1993). Contudo, observa-se que os isolados recentes estão mais relacionados entre si, com maior identidade nucleotídica. Esta característica sugere que os isolados contemporâneos possam ter derivado de um progenitor filogenético distinto daquele dos isolados na década de 80 (Laird *et al.*, 2003).

A especificidade de genotipo P[8] em nosso estudo apresentou-se associada com diferentes G-tipos (G1, G5 e G9). Análise de seqüência do gene VP4 nesses isolados foi realizada e revelou estarem mais relacionados com duas linhagens, P[8]-2 e P[8]-3. As amostras de genotipo P[8]G5 (rj35400/87 e rj40644/90) agruparam com os isolados G5 BrH8 e Br1054 dentro da linhagem P[8]-2 (Alfieri *et al.*, 1996). Cabe ressaltar a distribuição temporal e geográfica dessas amostras, onde a análise do gene VP4 da amostra rj35400/87 isolada em 1987 estava geneticamente mais relacionada com o protótipo Br1054 isolado em 1986, ambas amostras provenientes do Rio de Janeiro. De maneira semelhante, a amostra rj40644/90 isolada em 1990 no Rio de Janeiro aparece mais relacionada com o isolado BrH8 de 1994 proveniente da cidade de Londrina, Paraná, sugerindo uma estabilidade do gene VP4.

Durante um estudo epidemiológico em Palermo, Itália, Arista *et al.* (2005) investigaram a variabilidade genética dos isolados de rotavírus e concluíram que os isolados P[8]G1 mais antigos (1989-1993) pertenciam à linhagem P[8]-1. As amostras de genotipo P[8]G1 e P[8]G9 isoladas anos mais tarde (1995-2003) pertenciam à linhagem P[8]-3. Esse agrupamento cronológico foi similar em nosso estudo, onde as amostras de genotipo P[8]G1, P[8]G5 e P[8]G9 isoladas entre 1986-1990 e 2001 pertenciam à linhagem P[8]-2, enquanto as amostras P[8]G1 e P[8]G9 isoladas entre 2002-2004 pertenciam à linhagem P[8]-3. Apesar dos genes que codificam as proteínas VP4 e VP7 segregarem independentemente, é possível que

os isolados das linhagens de P[8] associados ao genótipo G1 representem a combinação VP4-VP7 mais estável e capaz de ser mantida *in natura*, como vem sendo detectada ao longo dos anos. Estes dados são importantes em relação à vacinação, pois a mesma é genótipo P[8]G1 (Rotarix™).

O genótipo P[4] tem sido descrito em baixas frequências no Brasil, usualmente associada com genótipo G2 variando entre 21-26% (Araújo *et al.*, 2002; Mascarenhas *et al.*, 2002). Recentemente, P[4] foi descrito em 1% das amostras em São Paulo (Carmona *et al.*, 2006) e nenhuma detecção associada a este genótipo foi descrita na cidade de Salvador, Bahia (Santos *et al.*, 2005). No Rio de Janeiro, Volotão *et al.* (2006) detectaram o isolado R291 de especificidade P[4]G8, um genótipo não-usual, que analisado filogeneticamente em nosso estudo formou um grupo distinto dos outros isolados P[4].

A presente investigação identificou linhagens e sublinhagens dentro dos diferentes genótipos de rotavírus isolados na cidade do Rio de Janeiro. Ressalta-se a importância da execução de técnicas de caracterização molecular, com o objetivo de monitorar as possíveis mudanças que podem ocorrer nos genótipos de rotavírus circulantes. Esses dados mostram que uma vigilância nas infecções causadas por rotavírus é necessária a fim de se conhecer como esses vírus evoluem, possibilitando avaliar como as diferenças genéticas e antigênicas dos genótipos podem afetar a efetividade de uma vacina.

3.2. Análise Molecular dos genes NSP4 e VP6 (Anexos 2, 3 e 4)

A NSP4 possui características importantes tanto na fisiologia como na patologia dos rotavírus, contribuindo assim para o conhecimento sobre o uso de drogas e vacinas anti-rotavírus. Ainda assim é desconhecido o efeito da inclusão da NSP4 nas estratégias de vacina. O gene da NSP4 dos rotavírus de grupo A estão classificados em 5 genótipos distintos: NSP4A-KUN, NSP4B-Wa, NSP4C-AU1, NSP4D-EW e NSP4E-avian-like, somente os genótipos A, B e C infectando humanos (Lin & Tian, 2003). No presente estudo, 30 amostras de rotavírus coletadas de crianças hospitalizadas foram analisadas e definidas quanto ao genótipo de NSP4. As amostras foram selecionadas pelo ano de coleta, sendo quatro amostras do ano de 2001, nove de 2002, oito de 2003, cinco de 2004 e uma amostra representativa para cada um dos anos de 1986, 1987, 1988 e 1990. Vinte e

oito amostras foram classificadas como pertencentes ao genótipo NSP4B-Wa e duas ao genótipo NSP4A-KUN.

A diversidade de genótipos de NSP4 encontrada em humanos pode ser melhor investigada quanto à sua importância, considerando que a NSP4 tem sido descrita atuando de forma significativa na imunidade e proteção da infecção por rotavírus (Ball *et al.*, 2005). Em nosso estudo porém, não foi possível relacionar os genótipos de NSP4 identificados com a imunidade dos pacientes.

Os genótipos de NSP4 encontrados em nosso estudo corroboram com estudos realizados em outros países que descrevem amostras de rotavírus de genótipos G2 e não-G2 relacionados aos genótipos NSP4A-KUN e NSP4B-Wa, respectivamente. Ou seja, em nosso estudo as amostras de genótipo P[8]G1, P[8]G5 e P[8]G9 foram classificadas como pertencendo ao genótipo NSP4B-Wa e amostras de genótipo P[4]G2 pertencendo ao genótipo NSP4A-KUN (Anexo 3, fig. 1).

Mascarenhas *et al.* (2006) descreveram que na cidade de Belém, Pará, as amostras P[6]G2 detectadas apresentaram 100% de homologia com o genótipo NSP4A-KUN. Tais amostras foram coletadas de neonatos hospitalizados com diarreia aguda adquirida na comunidade e nosocomial, incluindo também neonatos com infecção nosocomial assintomática. É interessante observar que não foi diferenciado o genótipo de NSP4 nos rotavírus G2 provenientes de neonatos assintomáticos. Do mesmo modo, Lee *et al.*, (2000) descreveram na Tailândia amostras P[6]G1 de neonatos assintomáticos agrupando ao genótipo NSP4B-Wa, formando um cluster separado, porém apresentando alta homologia com as amostras G1 de crianças com diarreia. Esses dados são consistentes com os descritos em outras investigações (Angel *et al.*, 1998; Horie *et al.*, 1997) que sugerem que o gene da NSP4 não seja o único fator patogênico determinante na infecção por rotavírus.

A análise filogenética de quatro amostras representativas dos anos de 1986, 1987, 1988 e 1990 em nosso estudo, mostrou o agrupamento das mesmas em um cluster separado dentro do genótipo NSP4B-Wa. A maioria das amostras coletadas entre 2001-2004 formou um grupo separado, sugerindo que a proteína NSP4 esteja sofrendo mutações em sua sequência temporalmente, mutações essas geradas como resultado de uma forte pressão seletiva (Anexo 3, fig. 1).

A região no gene da VP6 que define os epítomos de SG foi amplificada e realizada a classificação molecular de todas as amostras do estudo. A análise das seqüências mostrou que as amostras de SGI estão associadas com NSP4A-KUN e amostras de SGII estão associadas com NSP4B-Wa, como demonstrado por Iturriza-Gómara *et al.* (2003). Como já descrito anteriormente para o gene VP6, somente os SGI e SGII são caracterizados em rotavírus humanos. Dessa forma, pode-se afirmar que a diversidade do gene da NSP4 nos rotavírus humanos está restrita somente a dois (NSP4A-KUN e NSP4B-Wa) dos cinco genótipos de NSP4 descritos.

No processo de maturação das DLPs a NSP4 serve como receptor para a VP6, mediando a internalização dessas partículas para o lúmen do RE (Estes, 2001). Essa associação direta entre as proteínas pode ser a causa da correlação que existe entre genótipos de NSP4 e SGs de VP6.

As seqüências de aminoácidos da proteína NSP4 relatadas em nosso estudo foram comparadas. Observou-se divergências significativas entre os genótipos de NSP4, principalmente no domínio citoplasmático da proteína, exatamente onde ocorre a interação com VP6. De maneira semelhante, o domínio variável inter-espécies apresentou maior divergência nas posições 131, 133 e 136-141 de aminoácidos, sendo esse o domínio onde a proteína NSP4 é diferenciada entre os seus genótipos. Zhang e colaboradores (1998) descreveram substituições de aminoácidos na região variável de rotavírus de origem suína (protótipo viral Gottfried) e associa este dado com alteração na virulência. Em nossa análise, a região de ligação das DLPs (aa156-175) possui cinco substituições entre os genótipos A e B de NSP4 nas posições 157, 161, 167, 169 e 174 de aminoácidos. Essas mudanças podem ser significativas, a fim de identificar a ligação entre os segmentos de NSP4 e VP6 de rotavírus, uma vez que a VP6 é responsável pela classificação de grupos e subgrupos de rotavírus.

IV. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

4.1. Conclusões

- As 30 amostras selecionadas para este estudo agruparam em dois genótipos de NSP4 distintos, 2 amostras NSP4A-KUN e 28 amostras NSP4B-Wa.
- Na análise filogenética, os genótipos de VP4 e VP7 das amostras mostraram-se relacionados ao genótipos de NSP4 encontrados. Os genótipos G2 pertencendo ao NSP4A-KUN e os genótipos não-G2 pertencendo ao NSP4B-Wa.
- As quatro amostras representativas dos anos de 1986, 1987, 1988 e 1990 agruparam-se separadamente dos outros isolados dentro do genótipo NSP4B-Wa, sugerindo que esta proteína esteja sendo modificada ao longo dos anos.
- A caracterização molecular da proteína VP6 nas amostras classificou 2 amostras SGI e 29 amostras SGII.
- A análise das seqüências de VP6 mostrou que existe uma correlação entre os SG e os genótipos de NSP4, onde os isolados de SGI estão associados com NSP4A-KUN e os isolados de SGII com NSP4B-Wa.
- A árvore filogenética do genótipo G1 construída a partir do gene VP7 mostrou sete amostras (2002-2004) agrupando na linhagem G1-3 e uma amostra (1986) na linhagem G1-4, sugerindo modificações genéticas temporais.
- Todas amostras de genótipo G2 foram classificadas na linhagem G2-1.

- A análise do gene VP7 das amostras G5 confirma a presença deste genótipo na cidade do Rio de Janeiro pelo menos há 19 anos, considerando que as duas amostras datam de 1987 e 1990.
- Todas amostras de genótipo G9 foram classificadas na linhagem G9-3.
- Duas linhagens do genótipo P[8] foram detectadas: P[8]-2 e P[8]-3; as amostras mais recentes pertencem à linhagem P[8]-3.

4.2. Perspectivas

As técnicas moléculas representam uma ferramenta importante na caracterização genética dos genótipos de rotavírus, tanto de NSP4 como de VP4 e VP7. É importante a continuação desse tipo de análise nas amostras circulantes, principalmente após a introdução de uma vacina. Os dados a serem obtidos ajudarão a verificar o papel da NSP4 no processo de infecção, uma vez que a NSP4 tem sido descrita atuando na imunidade e proteção na infecção por rotavírus. A análise de linhagens e sub-linhagens de VP4 e VP7 contribuirá no conhecimento epidemiológico, sendo possível avaliar quais genótipos e variantes devem ser incluídos na elaboração de novas vacinas.

V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFIERI AA, LEITE JP, NAKAGOMI O, KAGA E, WOODS PA, GLASS RI, GENTSCH JR. Characterization of human rotavirus genotype P[8]G5 from Brazil by probe-hybridization and sequence. *Arch Virol.* 141(12):2353-2364, 1996.
- ANGEL J, TANG B, FENG N, GREENBERG HB, BASS D. Studies of the role for NSP4 in the pathogenesis of homologous murine rotavirus diarrhea. *J Infect Dis.* 177(2):455-458, 1998.
- ARAÚJO IT, FERREIRA MSR, FIALHO AM, ASSIS RM, CRUZ CM, ROCHA M, LEITE JPG. Rotavirus genotypes P[4]G9, P[6]G9, and P[8]G9 in hospitalized children with acute gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Microbiol* 39, 1999-2001, 2001.
- ARAÚJO IT, FIALHO AM, DE ASSIS RM, ROCHA M, GALVAO M, CRUZ CM, FERREIRA MS, LEITE JP. Rotavirus strain diversity in Rio de Janeiro, Brazil: characterization of VP4 and VP7 genotypes in hospitalized children. *J Trop Pediatr.* 48(4):214-218, 2002.
- ARAÚJO IT, HEINEMANN MB, MASCARENHAS JDP, DE ASSIS RM, FIALHO AM, LEITE JP. Molecular Analysis of NSP4 and VP6 Genes of Rotavirus Strains Recovered from Hospitalized Children in Rio de Janeiro, Brazil. SUBMITTED, 2006.
- ARIAS CF, DECTOR MA, SEGOVIA L, LOPEZ T, CAMACHO M, ISA P, ESPINOSA R, LOPEZ S. RNA silencing of rotavirus gene expression. *Virus Res.* 102(1):43-51, 2004.

- ARISTA S, VIZZI E, FERRARO D. et al. Distribution of VP7 serotypes and VP4 genotypes among rotavirus strains recovered from Italian children with diarrhea. Arch. Virol. 142(10): 2065-2071, 1997.
- ARISTA S, GIAMMANCO GM, DE GRAZIA S, COLOMBA C, MARTELLA V. Genetic variability among serotype G4 Italian human rotaviruses. J. Clin. Microbiol. 43(3):1420-1425, 2005.
- BALL JM, TIAN P, ZENG CQW, MORRIS AP, ESTES MK. Age-dependent diarrhea induced by a rotavirus nonstructural glycoprotein. Science, 272: 101-104, 1996
- BALL JM, MITCHELL DM, GIBBONS TF, PARR RD. Rotavirus NSP4: a multifunctional viral enterotoxin. Viral Immunol 18: 2-3, 2005.
- BANYAI K, GENTSCH JR, SCHIPP R, JAKAB F, BENE J, MELEGH B, GLASS RI, SZUCS G. Molecular epidemiology of human P[8],G9 rotaviruses in Hungary between 1998 and 2001. J Med Microbiol. 53(Pt 8):791-801, 2004.
- BARREIROS MA, ALFIERI AA, ALFIERI AF, MEDICI KC, LEITE JP. An outbreak of diarrhoea in one-week-old piglets caused by group A rotavirus genotypes P[7],G3 and P[7],G5. Vet Res Commun. 27(6):505-512, 2003.
- BEARDS G, XU L, BALLARD A, DESSELBERGER U, McCRAE MA. A serotype 10 human rotavirus. J. Clin. Microbiol. 30 (6):1432-1435, 1992.
- BERNSTEIN DI. et al. Evaluation of rhesus rotavirus monovalent and tetravalent reassortant vaccines in US children. JAMA (Journal of the American Medical Association) 273: 1191-1196, 1995.
- BISHOP RF, DAVIDSON GP, HOLMES IH, RUCK BJ. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. Lancet 2:1281-1283, 1973.
- BISHOP RF, BUGG HC, MASENDYCZ PJ, LUND JS, GORREL RJ, BARNES GL. Serum, fecal, and breast milk rotavirus antibodies as indices of infection in mother-infant pairs. J. Infect. Dis. 96:174 (Suppl. 1), S23-29, 1996.
- BOK K, PALACIOS G, SIJVARGER K, MATSON D, GOMEZ J. Emergence of G9 P[6] human rotaviruses in Argentina: phylogenetic relationships among G9 strains. J Clin Microbiol. 39(11):4020-4025, 2001.
- BOK K, MATSON DO, GOMEZ JA. Genetic variation of capsid protein VP7 in genotype g4 human rotavirus strains: simultaneous emergence and spread of different lineages in Argentina. J Clin Microbiol. 40(6):2016-2022, 2002.

- BON F, FROMANTIN S, AHO S. et al. G and P genotyping of rotavirus strains circulating in France over a three-year period: detection of G9 and P[6] strains at low frequencies. *J. Clin. Microbiol.* 38 (4): 1681-1683, 2000.
- BOTH GW, BELLAMY AR, MITCHELL DB. Rotavirus protein structure and function. *Curr Top Microbiol Immunol.* 185:67-105, 1994.
- BOWMAN GD, NODELMAN IM, LEVY O, LIN SL, TIAN P, ZAMB TJ, UDEM SA, VENKATARAGHAVAN B, SCHUTT CE. Crystal structure of the oligomerization domain of NSP4 from rotavirus reveals a core metal-binding site. *J Mol Biol.* 15;304(5):861-871, 2000.
- BRANDT CD, ARNDT CW, EVANS GL, KIM HW, STALLINGS EP, RODRIGUEZ WJ, PARROTT RH. Evaluation of a latex test for rotavirus detection. *J Clin Microbiol.* 25(9):1800-1802, 1987.
- BRESEE J, FANG ZY, WANG B, NELSON EA, TAM J, SOENARTO Y, WILOPO SA, KILGORE P, KIM JS, KANG JO, LAN WS, GAIK CL, MOE K, CHEN KT, JIRAPHONGSA C, PONGUSWANNA Y, NGUYEN VM, PHAN VT, LE TL, HUMMELMAN E, GENTSCH JR, GLASS R. Asian Rotavirus Surveillance Network. First report from the Asian Rotavirus Surveillance Network. *Emerg Infect Dis.* 10(6):988-995, 2004.
- BROWNE EP, BELLAMY AR, TAYLOR JA. Membrane-destabilizing activity of rotavirus NSP4 is mediated by a membrane-proximal amphipathic domain. *J Gen Virol.* 81:1955-1959, 2000.
- BRÜSSOW H, NAKAGOMI O, GERNA G, EICHHORN W. Isolation of an avianlike group A rotavirus from a calf with diarrhea. *J. Clin. Microbiol.* 30(1):67-73, 1992.
- CARMONA RC, TIMENETSKY MDO C, DA SILVA FF, GRANATO CF. Characterization of rotavirus strains from hospitalized and outpatient children with acute diarrhoea in Sao Paulo, Brazil. *J Med Virol.* 74(1):166-172, 2004.
- CARMONA RC, TIMENETSKY MDO C, MORILLO SG, RICHTZENHAIN LJ. 2006. Human rotavirus serotype G9, Sao Paulo, Brazil, 1996-2003. *Emerg Infect Dis.* 12(6):963-968, 2006.
- CARVALHO-COSTA FA, ASSIS RM, FIALHO AM, BOIA MN, ALVES DP, MARTINS CM, LEITE JP. Detection and molecular characterization of group A rotavirus from hospitalized children in Rio de Janeiro, Brazil, 2004. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 101(3):291-4, 2006.

- CASTELLO AA, ARVAY ML, GLASS RI, GENTSCH J. Rotavirus strain surveillance in Latin America: a review of the last nine years. *Pediatr Infect Dis J.* 10:S168-172, 2004.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Intussusception among recipients of rotavirus vaccine--United States, 1998-1999. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* Jul 16;48(27):577-581, 1999.
- CHIBA S, YOKOYAMA T, NAKATA S. et al. Protective effect of naturally acquired homotypic and heterotypic rotavirus antibodies. *Lancet*, ii: 417-421, 1986.
- CLARK HF, HOSHINO Y, BELL LM, GROFF J, HESS G, BACHMAN P, OFFIT PA. Rotavirus isolate WI61 representing a presumptive new human serotype. *J Clin Microbiol.* 25(9):1757-1762, 1987.
- CLARK HF, BORIAN FE, BELL LM, MODESTO K, GOUVEA V, PLOTKIN SA. Protective effect of WC3 vaccine against rotavirus diarrhea in infants during a predominantly serotype 1 rotavirus season. *J Infect Dis.* 158(3):570-587, 1988.
- CLARK HF, BERNSTEIN DI, DENNEHY PH, OFFIT P, PICHICHERO M, TREANOR J, WARD RL, KRAH DL, SHAW A, DALLAS MJ, LAURA D, EIDEN JJ, IVANOFF N, KAPLAN KM, HEATON P. Safety, efficacy, and immunogenicity of a live, quadrivalent human-bovine reassortant rotavirus vaccine in healthy infants. *J Pediatr.* 144(2):184-90, 2004.
- COOK N, BRIDGER J, KENDALL K, GOMARA MI, EL-ATTAR L, GRAY J. The zoonotic potential of rotavirus. *J Infect.* 48(4):289-302, 2004.
- CUBITT WD, STEELE AD, ITURRIZA M. Characterisation of rotaviruses from children treated at a London hospital during 1996: emergence of strains G9P2A[6] and G3P2A[6]. *J. Med Virol.* 61: 150-154, 2000.
- CUNLIFFE NA, WOODS PA, LEITE JPG, DAS BK, RAMACHANDRAN M, BHAN MK, HART CA, GLASS RI, GENTSCH JR. Sequence analysis of NSP4 gene of human rotavirus allows classification into two main genetic groups. *J Med Virol* 53, 41-50, 1997.
- CUNLIFFE NA, GONDWE JS, BROADHEAD RL. et al. Rotavirus G and P types in children with acute diarrhea in Blantyre, Malawi, from 1997 to 1998: predominance of novel P[6]G8 strains. *J. Med. Virol.* 57: 308-312, 1999.
- CUNLIFFE NA, DOVE W, BUNN JE, BEN RAMADAM M, NYANGAO JW, RIVERON RL, CUEVAS LE, HART CA. Expanding global distribution of rotavirus serotype G9: detection in Libya, Kenya, and Cuba. *Emerg Infect Dis.* 7(5):890-892, 2001.

- DAS BK, GENTSCH JR, HOSHINO Y, ISHIDA S, NAKAGOMI O, BHAN MK, KUMAR R, GLASS RI. Characterization of the G serotype and genogroup of New Delhi newborn rotavirus Strain 116E. *Virology*. 197(1):99-107, 1993.
- DAS BK, GENTSCH JR, CICIRELLO HG, WOODS PA, GUPTA A, RAMACHANDRAN M, KUMAR R, BHAN MK, GLASS RI. Characterization of rotavirus strains from newborns in New Delhi, India. *J Clin Microbiol*. 32(7):1820-1822, 1994.
- DAVIDSON GP, BISHOP RF, TOWNLEY RR. et al. Importance of a new virus in acute sporadic enteritis in children. *Lancet*, 1 (7901): 242-246, 1975.
- DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA, SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Informe Técnico. Doença Diarréica por Rotavírus: Vigilância Epidemiológica e Prevenção pela Vacina Oral de Rotavírus Humano (VORH), Novembro de 2005.
- DESSELBERGER U. Genome rearrangements of rotaviruses. *Adv. Virus Res*. 46: 69-95, 1996.
- DUNN SJ, BURNS JW, CROSS TL, VO PT, WARD RL, BREMONT M, GREENBERG HB. Comparison of VP4 and VP7 of five murine rotavirus strains. *Virology*. 203(2):250-259, 1994.
- DUNN SJ, FIORE L, WERNER RL, CROSS TL, BROOME RL, RUGGERI FM, GREENBERG HB. Immunogenicity, antigenicity, and protection efficacy of baculovirus expressed VP4 trypsin cleavage products, VP5(1)* and VP8* from rhesus rotavirus. *Arch Virol*. 140(11):1969-1978, 1995.
- ESTES MK. Rotaviruses and their replication. In: *Fields Virology*, 4th ed., vol. 2, pp. 1747-1785. Edited by B.N. Fields, D.N. Knipe, P.M. Howley, R.M. Chanock, J.L. Melnick, T.P. Monath, B. Roizman & S.E. Straus. New York: Lippincott-Raven, 2001.
- FENG N, BURNS JW, BRACY L, GREENBERG HB. Comparison of mucosal and systemic humoral immune responses and subsequent protection in mice orally inoculated with a homologous or a heterologous rotavirus. *J. Virol*. 68:7766-7773, 1994.
- FISCHER TK & GENTSCH JR. Rotavirus typing methods and algorithms. *Rev Med Virol*. 14(2):71-82, 2004.
- FISCHER TK, BRESEE JS, GLASS RI. Rotavirus vaccines and the prevention of hospital-acquired diarrhea in children. *Vaccine*. 22 Suppl 1:S49-54, 2004.

FLEWETT TH, BRYDEN AS, DAVIES H. Virus particles in gastroenteritis. *Lancet* 2:1497, 1973.

FLEWETT TH & WOODE GN. The rotaviruses. Brief review. *Arch. Virol.* 57(1): 1-23, 1978.

FLEWETT TH, ARIAS CF, AVENDANO LF, GHAFOR A, MATHAN MM, MENDIS L, MOE K, BISHOP RF. Comparative evaluation of the WHO and DAKOPATTS enzyme-linked immunoassay kits for rotavirus detection. *Bull World Health Organ.* 67(4):369-374, 1989.

FUJIWARA Y & NAKAGOMI O. Interspecies sharing of two distinct nonstructural protein 1 alleles among human and animal rotaviruses as revealed by dot blot hybridization. *J Clin Microbiol.* 35(10):2703-2705, 1997.

GENTSCH JR, GLASS RI, WOODS P. et al. Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 30(6): 1365-1373, 1992.

GENTSCH JR, WOODS PA, RAMACHANDRAN M, DAS B.K, LEITE JP, ALFIERI A, KUMAR R, BHAN MK, GLASS RI. Review of G and P typing results from a global collection of rotavirus strains: implications for vaccine development. *J Infect. Dis.* 174 1:S30-S36, 1996.

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.* 1;192 Suppl 1:S146-159, 2005.

GLASS RI, BRESEE JS, PARASHAR UD, JIANG B, GENTSCH J. The future of rotavirus vaccines: a major setback leads to new opportunities. *Lancet.* 363:1547-50, 2004.

GOUVEA V, SANTOS N, TIMENETSKY M DO C. Identification of bovine and porcine rotavirus G types by PCR. *J Clin Microbiol.* 32(5):1338-1340, 1994a.

GOUVEA V, DE CASTRO L, TIMENETSKY MC, GREENBERG H, SANTOS N. Rotavirus serotype G5 associated with diarrhea in Brazilian children. *J Clin Microbiol.* 32(5):1408-1409. Erratum in: *J Clin Microbiol* 32(7):1834, 1994b.

- GOUVEA, V. & SANTOS, N. Detection and characterization of novel rotavirus strains in the United States. *J Clin Microbiol.* 37(7):2385-6, 1999.
- GOUVEA V, LIMA RC, 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 Res.* 59(2):141-147, 1999.
- GREEN KY, HOSHINO Y, IKEGAMI N. Sequence analysis of the gene encoding the serotype-specific glycoprotein (VP7) of two new human rotavirus serotypes. *Virology.* 168(2):429-433, 1989.
- GREENBERG H, MCAULIFFE V, VALDESUSO J, WYATT R, FLORES J, KALICA A, HOSHINO Y, SINGH N. Serological analysis of the subgroup protein of rotavirus, using monoclonal antibodies. *Infect Immun.* 39(1):91-99, 1983.
- GRIFFIN DD, KIRKWOOD CD, PARASHAR UD, WOODS PA, BRESEE JS, GLASS RI, GENTSCH JR. Surveillance of rotavirus strains in the United States: identification of unusual strains. The National Rotavirus Strain Surveillance System collaborating laboratories. *J Clin Microbiol.* 38(7):2784-2787, 2000.
- GUERRERO CA, MENDEZ E, ZARATE S, ISA P, LOPEZ S, ARIAS CF. Integrin alpha(v)beta(3) mediates rotavirus cell entry. *Proc Natl Acad Sci USA.* 19;97(26):14644-14649, 2000.
- GUSMAO RH, MASCARENHAS JD, GABBAY YB, LINS-LAINSON Z, RAMOS FL, MONTEIRO TA, VALENTE SA, LINHARES AC. Rotaviruses as a cause of nosocomial, infantile diarrhoea in northern Brazil: pilot study. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 90(6):743-749, 1995.
- HABER P, CHEN RT, ZANARDI LR, MOOTREY GT, ENGLISH R, BRAUN MM. VAERS Working Group. An analysis of rotavirus vaccine reports to the vaccine adverse event reporting system: more than intussusception alone? *Pediatrics.* 113(4):e353-359, 2004.
- HANLON P, HANLON L, MARSH V, BYASS P, SHENTON F, HASSAN-KING M, JOBE O, SILLAH H, HAYES R, M'BOGE BH. Trial of an attenuated bovine rotavirus vaccine (RIT 4237) in Gambian infants. *Lancet.* 1(8546):1342-1345, 1987.
- HEATON PM, GOVEIA MG, MILLER JM, OFFIT P, CLARK HF. Development of a pentavalent rotavirus vaccine against prevalent serotypes of rotavirus gastroenteritis. *J Infect Dis.* 192 Suppl 1:S17-21, 2005.

- HEWISH MJ, TAKADA Y, COULSON BS. Integrins alpha2beta1 and alpha4beta1 can mediate SA11 rotavirus attachment and entry into cells. *J Virol.* 74(1):228-236, 2000.
- HORIE Y, MASAMUNE O, NAKAGOMI O. Three major alleles of rotavirus NSP4 proteins identified by sequence analysis. *J Gen Virol.* 78:2341-2346, 1997.
- HOSHINO, Y. & KAPIKIAN, A.Z. Rotavirus serotypes: classification and importance in epidemiology, immunity, and vaccine development. *J Health Popul Nutr.* 18(1):5-14, 2000.
- HOSHINO Y, WAGNER M, YAN XY, PEREZ-SCHAEEL I, KAPIKIAN AZ. Horizontal transmission of rhesus monkey rotavirus-based quadrivalent vaccine during a phase 3 clinical trial in Caracas, Venezuela. *J Infect Dis.* 187(5):791-800, 2003.
- HUANG H, SCHROEDER F, ESTES MK, MCPHERSON T, BALL JM. Interaction(s) of rotavirus non-structural protein 4 (NSP4) C-terminal peptides with model membranes. *Biochem J.* 15;380:723-733, 2004.
- INSTITUTO ADOLF LUTZ E CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA "PROFESSOR ALEXANDRE VRANJAC". Diarrhea and rotavirus. *Rev Saude Publica* 38(6):844-845, 2004.
- ITURRIZA-GOMARA M, ISHERWOOD B, DESSELBERGER U, GRAY J. Reassortment in vivo: driving force for diversity of human rotavirus strains isolated in the United Kingdom between 1995 and 1999. *J Virol.* 75(8):3696-3705, 2001.
- ITURRIZA-GOMARA 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* 76, 6956-6601, 2002.
- ITURRIZA-GOMARA M, ANDERTON E, KANG G, GALLIMORE C, PHILLIPS W, DESSELBERGER U, GRAY J. Evidence for genetic linkage between the gene segments encoding NSP4 and VP6 proteins in common and reassortant human rotavirus strains. *J Clin Microbiol* 41, 3566-3573, 2003.
- JAIN V, DAS BK, BHAN MK, GLASS RI, GENTSCH JR; INDIAN STRAIN SURVEILLANCE COLLABORATING LABORATORIES. Great diversity of group A rotavirus strains and high prevalence of mixed rotavirus infections in India. *J Clin Microbiol.* 39(10):3524-3529, 2001.

JAYARAM H, ESTES MK, PRASAD BV. Emerging themes in rotavirus cell entry, genome organization, transcription and replication. *Virus Res.* 101(1):67-81, 2004.

JIN Q, WARD RL, KNOWLTON DR, GABBAY YB, LINHARES AC, RAPPAPORT R, WOODS PA, GLASS RI, GENTSCH JR. Divergence of VP7 genes of G1 rotaviruses isolated from infants vaccinated with reassortant rhesus rotaviruses. *Arch. Virol.* 141(11):2057-2076, 1996.

JOENSUU J, KOSKENNIEMI E, PANG XL, VESIKARI T. Randomised placebo-controlled trial of rhesus-human reassortant rotavirus vaccine for prevention of severe rotavirus gastroenteritis. *Lancet.* 25,350:1205-1209, 1997.

JOHANSEN K, HINKULA J, ESPINOZA F, LEVI M, ZENG C, RUDEN U, VESIKARI T, ESTES M, SVENSSON L. Humoral and cell-mediated immune responses in humans to the NSP4 enterotoxin of rotavirus. *J Med Virol.* 59(3):369-377, 1999.

KANE EM, TURCIOS RM, ARVAY ML, GARCIA S, BRESEE JS, GLASS RI. The epidemiology of rotavirus diarrhea in Latin America. Anticipating rotavirus vaccines. *Rev Panam Salud Publica.* 16(6):371-377, 2004.

KANG G, ITURRIZA-GOMARA M, WHEELER JG, CRYSTAL P, MONICA B, RAMANI S, PRIMROSE B, MOSES PD, GALLIMORE CI, BROWN DW, GRAY J. Quantitation of group A rotavirus by real-time reverse-transcription-polymerase chain reaction: correlation with clinical severity in children in South India. *J. Med. Virol.* 73(1):118-22, 2004.

KAPIKIAN AZ, KIM HW, WYATT RG. Reoviruslike agent in stools: association with infantile diarrhea and development of serologic tests. *Science* 185:1049, 1974.

KAPIKIAN AZ, HOSHINO Y, CHANOCK RM. Rotaviruses. In: *Virology*. Third edition. Edited by FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M, et al.,(eds.). Vol 2. Philadelphia, Lippincott-Raven Press, p.1657-1708, 2001.

KHAMRIN P, PEERAKOME S, WONGSAWASDI L, TONUSIN S, SORNCHAI P, MANEERAT V, KHAMWAN C, YAGYU F, OKITSU S, USHIJIMA H, MANEEKARN N. Emergence of human G9 rotavirus with an exceptionally high frequency in children admitted to hospital with diarrhea in Chiang Mai, Thailand. *J Med Virol.* 78(2):273-280, 2006.

- KIRKWOOD CD & PALOMBO EA. Genetic characterization of the rotavirus nonstructural protein, NSP4. *Virology*. 236(2):258-265, 1997.
- KIRKWOOD CD, GENTSCH JR, GLASS RI. Sequence analysis of the NSP4 gene from human rotavirus strains isolated in the United States. *Virus Genes*. 19(2):113-22,1999.
- KRISHNAN T, BURKE B, SHEN S, NAIK TN, DESSELBERG U. Molecular epidemiology of human rotaviruses in Manipur: genome analysis of rotaviruses of long electropherotype and subgroup I. *Arch. Virol*. 134:279-292, 1994.
- LAIRD AR, GENTSCH JR, NAKAGOMI T, NAKAGOMI O, GLASS RI. Characterization of serotype G9 rotavirus strains isolated in the United States and India from 1993 to 2001. *J Clin Microbiol*. 41(7):3100-3111, 2003.
- LEE CN, WANG YL, KAO CL, ZAO CL, LEE CY, CHEN HN. NSP4 gene analysis of rotaviruses recovered from infected children with and without diarrhoea. *J Clin Microbiol* 38, 4471-4477, 2000.
- LEITE JPG, ALFIERI AA, WOODS PA, GLASS RI, GENTSCH JR. Rotavirus G and P types circulating in Brazil: characterization by RT-PCR, probe hybridization, and sequence analysis. *Arch Virol* 141, 2365-2374, 1996.
- LIN SL & TIAN P. Detailed computational analysis of a comprehensive set of group A rotavirus NSP4 proteins. *Virus Genes* 26: 271-282, 2003.
- LINHARES AC, LANATA CF, HAUSDORFF WP, GABBAY YB, BLACK RE. Reappraisal of the Peruvian and Brazilian lower titer tetravalent rhesus-human reassortant rotavirus vaccine efficacy trials: analysis by severity of diarrhea. *Pediatr Infect Dis J*. 18(11):1001-1006, 1999.
- LINHARES AC & BRESEE JS. Rotavirus vaccines and vaccination in Latin America. *Rev Panam Salud Publica*. 8(5):305-31, 2000.
- LOPEZ S & ARIAS CF. Multistep entry of rotavirus into cells: a Versaillesque dance. *Trends Microbiol*. 12(6):271-278, 2004.
- LUDERT JE, KRISHNANEY AA, BURNS JW, VO PT, GREENBERG HB. Cleavage of rotavirus VP4 in vivo. *J Gen Virol*. 77:391-395, 1996.
- MARTELLA V, CIARLET M, BASELGA R, ARISTA S, ELIA G, LORUSSO E, BANYAI K, TERIO V, MADIO A, RUGGERI FM, FALCONE E, CAMERO M, DECARO N, BUONAVOGLIA C. Sequence analysis of the VP7 and VP4 genes identifies a novel VP7 gene allele of porcine rotaviruses, sharing a common

- evolutionary origin with human G2 rotaviruses. *Virology*. 20;337(1):111-123, 2005.
- 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. Identification of a novel VP4 genotype carried by a serotype G5 porcine rotavirus strain. *Virology*. 15;346(2):301-311, 2006.
- MASCARENHAS JDP, LINHARES AC, GABBAY YB, De FREITAS RB, MENDEZ E, LÓPEZ S, ARIAS CF. Naturally occurring serotype 2/ subgroup II rotavirus reassortants in Northern Brazil. *Virus Res*. 14:235-240, 1989.
- 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 Belem, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 97(1):113-117, 2002.
- MASCARENHAS JDP, LINHARES AC, BAYMA APG, LIMA JC, SOUSA MS, ARAÚJO IT, HEINEMANN MB, GUSMÃO RHP, GABBAY YB, LEITE JPG. Molecular analysis of VP4, VP7 and NSP4 genes of P[6]G2 rotavirus genotype strains recovered from neonates admitted to hospital in Belém, Brazil. *J Med Virol* 78: 281-289, 2006.
- MATSON DO, O'RYAN ML, HERRERA I. Fecal antibody responses to symptomatic and asymptomatic rotavirus infections. *J. Infect. Dis*. 167: 577-583, 1993.
- MATSUNO S, HASEGAWA A, KALICA AR, KONO R. Isolation of a recombinant between simian and bovine rotaviruses. *J. Gen. Virol*. 48: 253, 1980.
- MATTHIJNSSENS J, RAHMAN M, MARTELLA V, XUELEI Y, DE VOS S, DE LEENER K, CIARLET M, BUONAVOGLIA C, VAN RANST M. Full genomic analysis of human rotavirus strain B4106 and lapine rotavirus strain 30/96 provides evidence for interspecies transmission. *J Virol*. 80(8):3801-3810, 2006.
- MAUNULA L & VON BONSDORFF CH. Short sequences define genetic lineages: phylogenetic analysis of group A rotaviruses based on partial sequences of genome segments 4 and 9. *J Gen Virol*. 79 (Pt 2):321-332, 1998.
- MERTENS P. The dsRNA viruses. *Virus Res*. 101(1):3-13, 2004.
- MORI Y, BORGAN MA, ITO N, SUGIYAMA M, MINAMOTO N. Diarrhea-inducing activity of avian rotavirus NSP4 glycoproteins, which differ greatly from mammalian rotavirus NSP4 glycoproteins in deduced amino acid sequence in suckling mice. *J Virol* 76, 5829-5834, 2002.

- MURPHY TV, GARGIULLO PM, MASSOUDI MS, NELSON DB, JUMAAN AO, OKORO CA, ZANARDI LR, SETIA S, FAIR E, LEBARON CW, WHARTON M, LIVENGOOD JR. Rotavirus Intussusception Investigation Team. Intussusception among infants given an oral rotavirus vaccine. *N Engl J Med.* 344(8):564-572, 2001.
- NAKAGOMI O & NAKAGOMI T. Molecular evidence for naturally occurring single VP7 gene substitution reassortant between human rotaviruses belonging to two different genogroups. *Arch. Virol.* 119: 67-81, 1991.
- NEWBURG DS, PETERSON JA, RUIZ-PALACIOS GM, MATSON DO, MORROW AL, SHULTS J, GUERRERO ML, CHATURVEDI P, NEWBURG SO, SCALLAN CD, TAYLOR MR, CERIANI RL, PICKERING LK. Role of human-milk lactadherin in protection against symptomatic rotavirus infection. *Lancet.* 351(9110):1160-1164, 1998.
- OFFIT PA. Vírus-specific cellular immune response to intestinal infection. In: *Viral Infections of the Gastrointestinal Tract.* Edited by KAPIKIAN, A.Z. New York: Marcel Dekker, p. 89-100, 1994.
- OFFIT PA. Host factores associated with protection against disease. The skies are clearing. *J. Infect. Dis.* 174 (suppl. 1) S59-64, 1996.
- 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.* 169: 504-511, 1994.
- O'RYAN M, PEREZ-SCHAEL I, MAMANI N, PENA A, SALINAS B, GONZALEZ G, GONZALEZ F, MATSON DO, GOMEZ J. Rotavirus-associated medical visits and hospitalizations in South America: a prospective study at three large sentinel hospitals. *Pediatr Infect Dis J.* 20(7):685-693, 2001.
- PAGE NA & STEELE AD. Antigenic and genetic characterization of serotype G2 human rotavirus strains from the African continent. *J Clin Microbiol.* 42(2):595-600, 2004a.
- PAGE NA & STEELE AD. Antigenic and genetic characterization of serotype G2 human rotavirus strains from South Africa from 1984 to 1998. *J Med Virol.* 72(2):320-327, 2004b.

- PAGER CT, ALEXANDER JJ, STEELE AD. South African G4P[6] asymptomatic and symptomatic neonatal rotavirus strains differ in their NSP4, VP8*, and VP7 genes. *J Med Virol.* 62(2):208-216, 2000.
- PALOMBO EA & BISHOP RF. Genetic and antigenic characterization of a serotype G6 human rotavirus isolated in Melbourne, Australia. *J. Med. Virol.* 47:348-354, 1995.
- PARASHAR UD, HOLMAN RC, BRESEE JS, CLARKE MJ, RHODES PH, DAVIS RL, THOMPSON RS, MULLOOLY JP, BLACK SB, SHINEFIELD HR, MARCY SM, VADHEIM CM, WARD JI, CHEN RT, GLASS RI. Epidemiology of diarrheal disease among children enrolled in four West Coast health maintenance organizations. Vaccine Safety Datalink Team. *Pediatr Infect Dis J.* 17(7):605-611, 1998.
- PARASHAR UD, HUMMELMAN EG, BRESEE JS, MILLER MA, GLASS RI. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerg. Infect. Dis.* 9:565-572, 2003.
- PARASHAR UD, GIBSON CJ, BRESSE JS, GLASS RI. Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerg Infect Dis.* 12(2):304-306, 2006.
- PARRA GI, BOK K, MARTINEZ M, GOMEZ JA. Evidence of rotavirus intragenic recombination between two sublineages of the same genotype. *J Gen Virol.* 85:1713-1716, 2004.
- PARRA GI & ESPINOLA EE. Nucleotide mismatches between the VP7 gene and the primer are associated with genotyping failure of a specific lineage from G1 rotavirus strains. *Virology J.* 3:35, 2006
- PEDLEY S, HUNDLEY F, CHRYSTIE I. et al. The genomes of rotaviruses isolated from chronically infected immunodeficient children. *J. Gen. Virol.* 65:1141-1150, 1984.
- PEREIRA HG, AZEREDO RS, LEITE JPG. et al. Comparison of polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), immuno-electron microscopy (IEM) and enzyme immunoassay (EIA) for the rapid diagnosis of rotavirus infection in children. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz,* 78(4): 483-490, 1983.
- PEREIRA HG, AZEREDO RS, LEITE JP, ANDRADE ZP, DE CASTRO L. A combined enzyme immunoassay for rotavirus and adenovirus (EIARA). *J Virol Methods.* 10(1):21-28, 1985.

- PEREIRA HG, LINHARES AC, CANDEIAS JA, GLASS RI. National laboratory surveillance of viral agents of gastroenteritis in Brazil. *Bull Pan Am Health Organ.* 27(3):224-233, 1993.
- PEREZ-SCHAEL I, GUNTINAS MJ, PEREZ M, PAGONE V, ROJAS AM, GONZALEZ R, CUNTO W, HOSHINO Y, KAPIKIAN AZ. Efficacy of the rhesus rotavirus-based quadrivalent vaccine in infants and young children in Venezuela. *N Engl J Med.* 337(17):1181-1187, 1997.
- PEREZ-SCHAEL I, GONZALEZ R, FERNANDEZ R, ALFONZO E, INATY D, BOHER Y, SARMIENTO L. Epidemiological features of rotavirus infection in Caracas, Venezuela: implications for rotavirus immunization programs. *J Med Virol.* 59(4):520-526, 1999.
- PEREZ-VARGAS J, ISA P, LOPEZ S, ARIAS CF. Rotavirus vaccine: early introduction in Latin America-risks and benefits. *Arch Med Res.* 37(1):1-10, 2006.
- RACZ ML, KROEFF SS, MUNFORD V, CARUZO TA, DURIGON EL, HAYASHI Y, GOUVEA V, PALOMBO EA. Molecular characterization of porcine rotaviruses from the southern region of Brazil: characterization of an atypical genotype G[9] strain. *J Clin Microbiol.* 38(6):2443-2446, 2000.
- RAHMAN M, MATTHIJNSSENS J, NAHAR S, PODDER G, SACK DA, AZIM T, VAN RANST M. Characterization of a novel P[25]G11 human Group A rotavirus. *J Clin Microbiol* 43, 3208-3212, 2005.
- RAO CD, DAS M, ILANGO P, LALWANI R, RAO BS, GOWDA K. Comparative nucleotide and amino acid sequence analysis of the sequence-specific RNA-binding rotavirus nonstructural protein NSP3. *Virology.* 207(1):327-333, 1995.
- REIDY N, O'HALLORAN F, FANNING S, CRYAN B, O'SHEA H. Emergence of G3 and G9 rotavirus and increased incidence of mixed infections in the southern region of Ireland 2001-2004. *J Med Virol.* 77(4):571-578, 2005.
- RENNELS MB, GLASS RI, DENNEHY PH, BERNSTEIN DI, PICHICHERO ME, ZITO ET, MACK ME, DAVIDSON BL, KAPIKIAN AZ. Safety and efficacy of high-dose rhesus-human reassortant rotavirus vaccines--report of the National Multicenter Trial. United States Rotavirus Vaccine Efficacy Group. *Pediatrics.* 97(1):7-13, 1996.

- ROSA E SILVA ML, PIRES DE CARVALHO I, GOUVEA V. 1998-1999 rotavirus seasons in Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil: detection of an unusual G3P[4] epidemic strain. *J Clin Microbiol.* 40(8):2837-2842, 2002.
- RUBILAR-ABREU E, HEDLUND KO, SVENSSON L, MITTELHOLZER C. Serotype G9 rotavirus infections in adults in Sweden. *J Clin Microbiol.* 43(3):1374-1376, 2005.
- RUIZ-PALACIOS GM, PEREZ-SCHAEEL I, VELAZQUEZ FR, ABATE H, BREUER T, CLEMENS SC, CHEUVART 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, SALMERON J, RUTTIMANN R, TINOCO JC, RUBIO P, NUNEZ E, GUERRERO ML, YARZABAL JP, DAMASO S, TORNIÉPORTH N, SAEZ-LLORENS X, VERGARA RF, VESIKARI T, BOUCKENOOGHE A, CLEMENS R, DE VOS B, O'RYAN M; HUMAN ROTAVIRUS VACCINE STUDY GROUP. Safety and efficacy of an attenuated vaccine against severe rotavirus gastroenteritis. *N Engl J Med.* 354(1):11-22, 2006.
- SALINAS B, SCHAEEL IP, LINHARES AC. Evaluation of safety, immunogenicity and efficacy of an attenuated rotavirus vaccine, RIX4414: a randomized, placebo-controlled trial in Latin American infants. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 24:807-816, 2005.
- SANTOS N, LIMA RC, NOZAWA CM, LINHARES RE, GOUVEA V. Detection of porcine rotavirus type G9 and of a mixture of types G1 and G5 associated with Wa-like VP4 specificity: evidence for natural human-porcine genetic reassortment. *J Clin Microbiol.* 37(8):2734-2736, 1999.
- SANTOS N, VOLOTAO EM, SOARES CC, ALBUQUERQUE MC, DA SILVA FM, DE CARVALHO TR, PEREIRA CF, CHIZHIKOV V, HOSHINO Y. Rotavirus strains bearing genotype G9 or P[9] recovered from Brazilian children with diarrhea from 1997 to 1999. *J Clin Microbiol.* 39(3):1157-1160, 2001.
- SANTOS N, VOLOTAO 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.* 43(8):4064-4069, 2005.

- SANTOS N & HOSHINO Y. Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *Rev Med Virol.* 15(1):29-56, 2005.
- SORIANO-GABARRÓ M, MRUKOWICZ J, VESIKARI T, VERSTRAETEN T. Burden of rotavirus disease in European Union countries. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 25:S7-S11, 2006.
- SOUZA MB, RACZ ML, LEITE JP, SOARES CM, MARTINS RM, MUNFORD V, CARDOSO DD. Molecular and serological characterization of group a rotavirus isolates obtained from hospitalized children in Goiania, Brazil, 1998-2000. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 22(7):441-443, 2003.
- STEYER A, POLJSAK-PRIJATELJ M, BARLIC-MAGANJA D, BUFON T, MARIN J. The emergence of rotavirus genotype G9 in hospitalised children in Slovenia. *J Clin Virol.* 33(1):7-11, 2005.
- TANIGUCHI K, URASAWA T, URASAWA S. Species specificity and interspecies relatedness in VP4 genotypes demonstrated by VP4 sequence analysis of equine, feline, and canine rotavirus strains. *Virology* 200:390-400, 1994.
- TANIGUCHI K & URASAWA S. Diversity in rotavirus genomes. *Seminars in Virology*, Vol. 6, pp. 123-131, 1995.
- TARAPOREWALA ZF, PATTON JT. Nonstructural proteins involved in genome packaging and replication of rotaviruses and other members of the Reoviridae. *Virus Res.* 101(1):57-66, 2004.
- TAYLOR JA & BELLAMY AR. Interaction of the rotavirus nonstructural glycoprotein NSP4 with the viral and cellular components. In: *Viral gastroenteritis*, pp. 225-235, Desselberger U & Gray J, editors. Elsevier Science, Amsterdam, The Netherlands, 2003.
- TIAN P, ESTES MK, HU Y, BALL JM, ZENG CQ, SCHILLING WP. The rotavirus nonstructural glycoprotein NSP4 mobilizes Ca²⁺ from the endoplasmic reticulum. *J Virol.* 69(9):5763-5772, 1995.
- TIMENETSKY MCST, GOUVEA V, SANTOS N. et al. Novel human rotavirus serotype with dual G5-G11 specificity. *J. Gen. Virol.* 78:1373-1378, 1997.
- UNICOMB LE, PODDER G, GENTSCH JR. et al. Evidence of high-frequency genomic reassortment of group A rotavirus strains in Bangladesh: emergence of type G9 in 1995. *J. Clin. Microbiol.* 37 (6): 1885-1891, 1999.

- VELAZQUEZ 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.* 335(14):1022-1028, 1996.
- VESIKARI T, ISOLAURI E, DELEM A, D'HONDT E, ANDRE FE, BEARDS GM, FLEWETT TH. Clinical efficacy of the RIT 4237 live attenuated bovine rotavirus vaccine in infants vaccinated before a rotavirus epidemic. *J Pediatr.* 107(2):189-94, 1985.
- VESIKARI T, KAPIKIAN AZ, DELEM A, ZISSIS G. A comparative trial of rhesus monkey (RRV-1) and bovine (RIT 4237) oral rotavirus vaccines in young children. *J Infect Dis.* 153(5):832-9, 1986.
- VESIKARI T, KARVONEN A, PUUSTINEN L. et al. Efficacy of RIX4414 live attenuated human rotavirus vaccine in Finnish infants. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 23:937-943, 2004.
- VOLOTAO EM, SOARES CC, MARANHAO AG, ROCHA LN, HOSHINO Y, SANTOS N. Rotavirus surveillance in the city of Rio de Janeiro-Brazil during 2000-2004: detection of unusual strains with G8P[4] or G10P[9] specificities. *J Med Virol.* 78(2):263-272, 2006.
- WARD RL. Mechanism of protection against rotavirus in humans and mice. *J. Infect. Dis.* 174: S47-S50, 1996.
- WEN L, USHIJIMA H, KAKIZAWA J, FANG ZY, NISHIO O, MORIKAWA S, MOTOHIRO T. Genetic variation in VP7 gene of human rotavirus serotype 2 (G2 type) isolated in Japan, China, and Pakistan. *Microbiol Immunol.* 39(11): 911-915, 1995.
- WICKELGREN I. How rotavirus causes diarrhea. *Science* 287(5452):409- 411, 2000.
- WILHELMI I, ROMAN E, SANCHEZ-FAUQUIER A. Viruses causing gastroenteritis. *Clin Microbiol Infect.* 9(4):247-62, 2003.
- YUAN L, WARD LA, ROSEN BI. Systematic and intestinal antibody-secreting cell responses and correlates of protective immunity to human rotavirus in a gnotobiotic pig model of disease. *J. Virol.* 70:3075-3083, 1996.
- ZARATE S, ESPINOSA R, ROMERO P, MENDEZ E, ARIAS CF, LOPEZ S. The VP5 domain of VP4 can mediate attachment of rotaviruses to cells. *J Virol.* 74(2):593-599, 2000.

ZHANG M, ZENG CQ, DONG Y, BALL JM, SAIF LJ, MORRIS AP, ESTES MK.

Mutations in rotavirus nonstructural glycoprotein NSP4 are associated with altered virus virulence. *J Virol* 72, 3666-3672, 1998.

ZHOU Y, SUPAWADEE J, KHAMWAN C, TONUSIN S, PEERAKOME S, KIM B, KANESHI K, UEDA Y, NAKAYA S, AKATANI K, MANEEKARN N, USHIJIMA H.

Characterization of human rotavirus serotype G9 isolated in Japan and Thailand from 1995 to 1997. *J. Med. Virol.* 65(3):619-28, 2001.

ZHOU Y, LI L, OKITSU S, MANEEKARN N, USHIJIMA H. Distribution of human rotaviruses, especially G9 strains, in Japan from 1996 to 2000. *Microbio. Immunol.* 47(8):591-9, 2003.

ANEXO 1

BRAZILIAN P[8]G1, P[8]G5, P[8]G9 AND P[4]G2 ROTAVIRUS STRAINS: NUCLEOTIDE SEQUENCE AND PHYLOGENETIC ANALYSIS

Submetido à publicação na revista *Journal of Medical Virology*

Brazilian P[8]G1, P[8]G5, P[8]G9 and P[4]G2 Rotavirus Strains:

Nucleotide Sequence and Phylogenetic Analysis

Irene Trigueiros Araújo¹, Rosane M. Santos Assis¹, Alexandre Madi Fialho¹, Joana D'Arc P. Mascarenhas², Marcos Bryan Heinemann³ and José Paulo G. Leite^{1*}.

¹*Department of Virology, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil*

²*Virology Section, Instituto Evandro Chagas, Ministério da Saúde, Ananindeua, Brazil*

³*Veterinary Section, UFMG, Belo Horizonte, Brazil*

Abstract

Rotavirus epidemiological surveys with molecular analysis of strains are required for gastroenteritis control and prevention. Twenty-nine human rotavirus strains detected in Rio de Janeiro, Brazil, from 1986-2004 were characterized as P[8]G1, P[8]G5, P[8]G9 and P[4]G2 genotypes. The VP7 genes were sequenced and phylogenetic analysis was performed. Strains of genotype G1 revealed two distinct lineages, G1-3 and G1-4; strains of genotype G2 grouped in lineage G2-1; G5 strains clustered with other Brazilians G5 strains and G9 strains were closely related to each other in lineage G9-3, distinct from the original G9 strains detected in 1980s. The VP4 genes were analyzed and P[8] strains fell into two major genetic lineages, P[8]-2 and P[8]-3. Our findings document an intragenotype diversity represented by lineages and sublineages within rotavirus circulating in Rio de Janeiro from 1986-2004, before application of a vaccine in Brazil. This report emphasizes the importance of continuing monitor genotypes to verify possible changes due to vaccination in child population in Brazil.

INTRODUCTION

Rotavirus is the leading cause of dehydrating diarrhea in infants and children throughout the world and is associated with significant mortality mainly in the developing countries, where approximately 611,000 deaths occur annually. In developed countries remain as a common cause of hospitalizations and clinic visits, with significant economic burden (Parashar et al., 2006; Charles et al., 2006). Rotavirus are triple-layered particles and comprise a genome with 11 segments of double stranded RNA (dsRNA). Classification of genotypes is made according to the genetic and antigenic diversity of the two outer capsid proteins VP7 and VP4, defining 15 G (glycoprotein) and 26 P (protease) types, respectively (Estes, 2001; Martella et al., 2006). Of these, 4 rotavirus G genotypes (G1-G4) and 2 P genotypes (P[8] and P[4]) have been described as the most frequent types correlated with human rotavirus infection worldwide. Epidemiological studies in different parts of the world with molecular typing of rotavirus have showed genotype P[8] with G1, G3, and G4 specificities, whereas genotype P[4] appears combined with G2 (Gentsch et al., 2005; Santos and Hoshino, 2005). The continuing recent emergence of genotype G9 reported in various studies (Araújo et al., 2001; Bok et al., 2001; Kirkwood et al., 2003; Laird et al., 2003; Arista et al., 2004; Gentsch et al., 2005; Santos and Hoshino, 2005; Linhares et al., 2006), including its global distribution and clinical importance, indicate that this genotype had become the fifth most common globally strain. Moreover, studies of sequence analysis have described a genetic variation and rotavirus genotype G9 may be divided into three phylogenetic VP7 gene lineages (1-3) (Laird et al., 2003; Zhou et al., 2003; Hoshino et al., 2005). The same VP7 gene analysis has been reported within G1 and G2 types and revealed considerable genetic diversity. Xin et al. (1993) first reported that VP7 gene nucleotide sequences of G1 rotavirus strains from Japan and China could be divided into three lineages. Subsequent analysis of rotavirus strains from 12 countries indicated that four distinct lineages have evolved within genotype G1 (Jin et al.,

1996). Sequence analysis of VP7 gene was performed in G2 rotavirus in Japan, China and Pakistan and genetic variations were observed. Comparative nucleotide and amino acid sequences revealed three subtypes (Wen et al., 1995). Still, unusual genotypes may be identified and reach an epidemiological relevance in some geographical settings regarded as animal-like strains as genotypes G5 or G10 (Gouvea et al., 1994a; Alfieri et al., 1996; Volotão et al., 2006) or as human strains as G8 and G12 (Santos et al., 1998; Castello et al., 2006; Volotão et al., 2006) or as isolated from asymptomatic newborns excreting rotavirus as genotype P[6] (Desselberger et al., 2001; Mascarenhas et al., 2006). Rotavirus genotype P[8] and P[4] have been identified across the world, besides P[8] is indicated as epidemiologically relevant in humans. Sequencing and phylogenetic analysis of the VP4 gene has exhibited genetic diversity within P[8] type and distinct lineages have been described (1-4) (Gouvea et al., 1999; Cunliffe et al., 2001; Arista et al., 2005). Here we present the distribution of rotavirus genotypes during a four-year period (2001-2004) and of representative isolates from years 1986, 1987 and 1990. VP7 and VP4 genes of strains were characterized by sequence assay and phylogenetic analysis in order to evaluate the genetic evolution of Brazilian strains. The data on the analysis of circulating strains will be important to anticipate antigenic differences in rotavirus strains detected before vaccination in Brazil.

MATERIAL AND METHODS

Fecal samples and viral RNA. Twenty-nine stool specimens were obtained from hospitalized children with acute diarrhea in the city of Rio de Janeiro. Three of these samples were representative of years 1986, 1987 and 1990 and the remaining 26 were collected between 2001 and 2004. The viral dsRNA was extracted by the glass powder method (Boom et al., 1990).

PCR amplification and sequencing. Reverse transcription (RT) and amplification by PCR were applied to viral dsRNA in order to amplify VP7 and VP4 genes. In the first-round RT-PCR was used VP7 and VP4 consensus primers 9con1-con2 (Das et al., 1994) and 4con3-con2 (Gentsch et al., 1992) generating amplicons of 904b and 879b, respectively. After this first-round, determination of rotavirus G types was performed by using specific primers for genotypes G1-G4 and G9 described by Das et al. (1994) and G5 described by Gouvea et al. (1994a). For P types, primers were those described by Gentsch et al. (1992). DNA sequencing was performed by the dideoxynucleotide chain termination method, using the ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The primers for sequence reaction were the consensus primers used for RT-PCR amplification. The VP7 and VP4 sequences obtained were aligned and compared to others VP7 and VP4 sequences of human and animal rotaviruses available in GenBank/NCBI. Molecular characterization of genotypes G1, G2, G5, G9, P[8] and P[4] were made by phylogenetic analysis using the neighbor-joining method and the Tajima-Nei distance matrix (Tajima and Nei, 1984) listed in the MEGA analytical package (version 2.0).

Nucleotide Sequence Accession Numbers. The nucleotide sequence data reported in this work were submitted to GenBank with accession numbers DQ857928 - DQ857956 (VP7 gene) and DQ857899 - DQ857927 (VP4 gene).

RESULTS

Sequencing and phylogenetic analysis of VP7 gene. A comparative analysis of the nucleotide sequences of rotavirus VP7 gene was made and phylogenetic trees for G1, G2, G5 and G9 strains were constructed on the neighbour-joining method. Phylogenetic analysis of G1 rotavirus revealed that strains from 2002 to 2004 clustered in G1-3 genetic lineage (Fig. 1a), represented by strains Ban-48, Japan-418 and China-K17. The isolate rj31022/86 from 1986 clustered separately in G1-4 genetic lineage (96% bootstrap) with Wa, KU Japan and the Brazilian strain Brz2 (Fig. 1a). The G2 strains were from year 2002 and clustered with DS-1 and SA514GR strains belonging to the G2-1 genetic lineage (Fig. 1b). The G5 strains detected in the present study were collected in 1987 and 1990. By phylogenetic analysis, these two strains grouped along with a clade of Brazilian strains (Fig. 1c). Phylogenetic analysis of G9 rotavirus revealed that all strains from Rio de Janeiro presented very high homology (100% bootstrap) and identity with BD524 prototype strain belonging to G9-3 genetic lineage (Fig. 1d).

Sequencing and phylogenetic analysis of VP4 gene. Twenty-nine P[8] and two P[4] genotype strains were sequenced and analyzed to assess genetic diversity. All the P[8] strains clustered in two separate branches (Figure 2), P[8]-3 lineage represented by OP351 (100% bootstrap) and P[8]-2 lineage represented by F45 (80% bootstrap). The P[4] strains were compared with representative strains as IS-2, R291, MW333 and L26 (Figure 2). In this comparison, strains rj5323/02 and rj5619/02 grouped with L26, a P[4]G12 strain isolated in Philippine, and with MW333, a P[4]G8 strain isolated in Malawi, showing a bootstrap value of 89%.

DISCUSSION

Rotavirus is the main cause of dehydrating diarrhea in children and prevention through vaccination may be effective to control this disease. Many epidemiological surveillance programs have been conducted throughout the world in order to describe the distribution and prevalence of different genotypes for the introduction of a rotavirus vaccine (Gentsch et al., 1996; Jin et al., 1996; Griffin et al., 2000; O`Ryan et al., 2001; Bresee et al., 2004; Kane et al., 2004; Santos and Hoshino, 2005). Moreover, studies of intragenotype diversity have been carried out. Such studies can define genetic and antigenic variation of rotavirus by classification of genotypes into lineages and sublineages, providing a profile of strains that could potentially change vaccine efficacy (Wen et al., 1995; Gouvea et al., 1999; Bok et al., 2002; Laird et al., 2003; Martella et al., 2005). In our study, the phylogenetic trees obtained from VP7 and VP4 genes nucleotide sequence analysis of genotypes P[8]G1, P[4]G2 and P[8]G9 revealed lineages and sublineages. The P[8]G1 strains analyzed showed seven strains within G1-3 and P[8]-3 lineages, and one strain that grouped distinctly in G1-4 and P[8]-2 lineages (Figures 1a and 2). Based on this observation, it is important to note a similar analysis performed in rotavirus P[8]G1 strains from Finland, where results revealed that VP7 gene analysis belonged to G1-1 and G1-2 lineages, both associated with P[8]-1 lineage. Strains within VP7 G1-3 lineage was also described, but were associated with VP4 P[8]-2 lineage (Maunula and von Bonsdorff, 1998). Parra and Espinola (2006) conducted an investigation in 173 sequences of G1 rotavirus strains collected from GenBank and most of the sequences grouped within G1-1, G1-2 and G1-3 lineages, except for the Brazilian strain Brz2 that grouped within G1-4 lineage. In our analysis, rj31022/86 strain clustered with Brz2 in G1-4 lineage also (Figure 1a). Brz2 is a rotavirus strain from a child vaccinated with reassortant rhesus rotavirus vaccine (RRV-TV) in Belém, Brazil and our analysis shows these two strains closely related (Jin et al., 1996). It is interesting to note that Brz2 strain was isolated in the North of Brazil and rj31022/86 isolated in the Southeast of Brazil, approximately 3,000 Km distance. More recent strains (2002-2004) clustered separately,

revealing a considerable distance in the nucleotide identity from the vaccine strain. Since four distinct VP7 G1 lineages have been described (Jin et al., 1996; Parra and Espinola, 2006), it would be important to continue G1 intragenotype characterization of strains isolated from diarrhea cases in Brazil. The RIX4414 (Rotarix™; GlaxoSmithKline Biologicals) vaccine of P[8]G1 specificity has been widely implemented in Brazil this year and monitoring the antigenic differences in the VP7 protein of currently circulating G1 strains will help verify if diversity could be a challenger for vaccine efficacy. Our analysis on VP7 gene of G2 strains followed the genetic characterization made by Page and Steele (2004a; 2004b) in African G2 rotavirus isolates (Figure 1b). Phylogenetic tree shows the rj5323/02 and rj5619/02 strains clustering with G2 DS-1 (1976) and SA514GR (1987) strains considered by the authors as old strains, although Brazilian isolates date from 2002. In their analysis the African isolates recovered between 1996 and 2000 clustered in G2-2 lineage, which was further separated in four sublineages, G2-2a, G2-2b, G2-2c and G2-2d (Page and Steele, 2004b), as represented in our analysis. The VP7 gene of G5 rotavirus strains were analyzed and grouped with human Brazilian G5 strains BrH8 and Br1054 (Alfieri et al., 1996), clustering separately from porcine G5 strains OSU and JL94 (Figure 1c). Rotavirus G5 is circulating and infecting humans in Brazil for at least 23 years according to data published by Gouvea et al. (1994b). The G5 rotavirus strains in the present work (rj35400/87 and rj40644/90) were recovered from children with diarrhea in years 1987 and 1990, corroborating with the wide temporal distribution of this genotype in Brazil (Leite et al., 1996). The seventeen rotavirus G9 strains in our study clustered in G9-3 lineage and were closely related to G9 strains R44 and 1527 previously isolated in Rio de Janeiro (Figure 1d) (Araújo et al., 2001; Santos et al., 2001). Santos et al. (2005b) described a surveillance study in the city of Salvador, Bahia, in Northeast Brazil and G9 strains analyzed also belonged to lineage 3. As evidenced by molecular epidemiology studies conducted in many countries, most of G9 rotavirus strains isolated around the world are closely related to lineage 3 (Bányai et al., 2004, Rubilar-Abreu

et al., 2005, Khamrin et al., 2006). A phylogenetic characteristic of G9 rotavirus studies is that all strains analyzed are distantly related to the original P[8]G9 strains 116E (India), F45 (Japan) and W161 (United States) isolated in the 1980's (Clark et al., 1987; Green et al., 1989; Das et al., 1993). Furthermore, a greater nucleotide sequence identity is observed when recent strains are compared, suggesting that the contemporary G9 strains may have derived from a phylogenetic progenitor distinct from the G9 isolated in the 1980s (Laird et al., 2003). The P[8] specificity in our study was found to be associated with different G types (G1, G5 and G9) and sequence analysis of the VP4 gene of these strains revealed that they were more related within two lineages, P[8]-2 and P[8]-3 (Figure 2). Rotavirus P[8]G5 strains rj35400/87 and rj40644/90 clustered along with other Brazilian G5 strains, BrH8 and Br1054, within P[8]-2 lineage (Alfieri et al., 1996). An interesting finding was the temporal distribution of such strains, where the VP4 gene of rj35400/87 isolated in 1987 was genetically more closely related to Br1054 isolated in 1986, both recovered in Rio de Janeiro. The same way, rj40644/90 isolated in 1990 compared to BrH8 isolated in 1994, but considering that BrH8 was recovered in Londrina, Paraná, South of Brazil. During an epidemiological survey in Palermo, Italy, Arista et al. (2005) investigated the genetic variability of rotavirus strains and found that the older P[8]G1 strains (1989-1993) were identified belonging to lineage P[8]-1. The P[8]G1 and P[8]G9 strains recovered years later (1995-2003) clustered into lineage P[8]-3. In our study this chronological clustering was similar when P[8]G1, P[8]G5 and P[8]G9 strains from 1986-1990 and 2001 grouped in lineage P[8]-2 while P[8]G1 and P[8]G9 strains from 2002-2004 grouped in lineage P[8]-3, including one P[8]G9 strain from 2001 that fell separately (Figure 2). Despite the fact that VP7 and VP4 segregate independently, it is possible that lineages of P[8] strains associated with G1 specificity represent a more stable VP7-VP4 combination suitable to continue in nature, as detected all over the years. The P[4] specificity has been reported with alternate frequencies in Brazil, usually associated with G2 genotype ranging from 21-26% (Araújo et al., 2002; Mascarenhas et al., 2002). Recently, P[4]

was reported at low frequencies represented by 1% of samples in São Paulo (Carmona et al., 2006) and no detection in Salvador, Bahia (Santos et al., 2005b). Rotavirus surveillance conducted in Rio de Janeiro, Brazil, by Volotão et al. (2006) detected an unusual P[4]G8 strain R291 which formed a distinct cluster in our P[4] analysis (Figure 2). The present investigation identified lineages within different genotypes of rotavirus isolates in Rio de Janeiro, Brazil. These findings underscore that simultaneous surveillance of rotavirus infections is necessary to understand how rotaviruses evolve and to measure how genetic and antigenic differences in genotypes might affect the effectiveness of vaccination.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), the National Council for the Development of Science and Technology (CNPq) and CGLab/SVS (Ministry of Health), Brazil.

REFERENCES

Alfieri AA, Leite JP, Nakagomi O, Kaga E, Woods PA, Glass RI, Gentsch JR. 1996. Characterization of human rotavirus genotype P[8]G5 from Brazil by probe-hybridization and sequence. Arch Virol. 141(12):2353-2364.

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* 39(5):1999-2001.

Araujo IT, Fialho AM, de Assis RM, Rocha M, Galvao M, Cruz CM, Ferreira MS, Leite JP. 2002. Rotavirus strain diversity in Rio de Janeiro, Brazil: characterization of VP4 and VP7 genotypes in hospitalized children. *J Trop Pediatr*. 48(4):214-218.

Arista S, Giammanco GM, De Grazia S, Migliore MC, Martella V, Cascio A. 2004. Molecular characterization of the genotype G9 human rotavirus strains recovered in Palermo, Italy, during the winter of 1999-2000. *Epidemiol Infect*. 132(2):343-349.

Arista S, Giammanco GM, De Grazia S, Colomba C, Martella V. 2005. Genetic variability among serotype G4 Italian human rotaviruses. *J Clin Microbiol*. 43(3):1420-1425.

Banyai K, Gentsch JR, Schipp R, Jakab F, Bene J, Melegh B, Glass RI, Szucs G. 2004. Molecular epidemiology of human P[8],G9 rotaviruses in Hungary between 1998 and 2001. *J Med Microbiol*. 53(Pt 8):791-801.

Bok K, Palacios G, Sijvarger K, Matson D, Gomez J. 2001. Emergence of G9 P[6] human rotaviruses in Argentina: phylogenetic relationships among G9 strains. *J Clin Microbiol*. 39(11):4020-4025.

Bok K, Matson DO, Gomez JA. 2002. Genetic variation of capsid protein VP7 in genotype g4 human rotavirus strains: simultaneous emergence and spread of different lineages in Argentina. *J Clin Microbiol*. 40(6):2016-2022.

Boom RC, Sol JA, Salismans MMM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PME and van den Noordaa J. 1990. Rapid and simple method for the purification of nucleid acids. *J Clin Microbiol* 28:495-503.

Bresee J, Fang ZY, Wang B, Nelson EA, Tam J, Soenarto Y, Wilopo SA, Kilgore P, Kim JS, Kang JO, Lan WS, Gaik CL, Moe K, Chen KT, Jiraphongsa C, Ponguswanna Y, Nguyen VM, Phan VT, Le TL, Hummelman E, Gentsch JR, Glass R. 2004. Asian Rotavirus Surveillance Network. First report from the Asian Rotavirus Surveillance Network. *Emerg Infect Dis.* 10(6):988-995.

Carmona RC, Timenetsky Mdo C, Morillo SG, Richtzenhain LJ. 2006. Human rotavirus serotype G9, Sao Paulo, Brazil, 1996-2003. *Emerg Infect Dis.* 12(6):963-968.

Charles MD, Holman RC, Curns AT, Parashar UD, Glass RI, Bresee JS. 2006. Hospitalizations associated with rotavirus gastroenteritis in the United States, 1993-2002. *Pediatr Infect Dis J.* 25(6):489-493.

Clark HF, Hoshino Y, Bell LM, Groff J, Hess G, Bachman P, Offit PA. 1987. Rotavirus isolate WI61 representing a presumptive new human serotype. *J Clin Microbiol.* 25(9):1757-1762.

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(3):836-843.

Das BK, Gentsch JR, Hoshino Y, Ishida S, Nakagomi O, Bhan MK, Kumar R, Glass RI.

1993. Characterization of the G serotype and genogroup of New Delhi newborn rotavirus Strain 116E. *Virology*. 197(1):99-107.

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(7):1820-1822.

Desselberger U, Iturriza-Gomara M, Gray JJ. 2001. Rotavirus epidemiology and Surveillance.

Novartis Found Symp. 238:125-152.

Estes MK. 2001. Rotaviruses and their replication. In: Knipe DM and Howley PM, editors.

Fields Virology, 4th edition. Philadelphia, Pa: Lippincott Williams and Wilkins, pp 1747-1785.

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(6):1365-1373.

Gentsch JR, Woods PA, Ramachandran M, Das BK, Leite JP, Alfieri A, Kumar R, Bhan MK,

Glass RI. 1996. Review of G and P typing results from a global collection of rotavirus strains: implications for vaccine development. *J Infect Dis*. 174 Suppl 1:S30-36.

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.

2005. Serotype diversity and reassortment between human and animal rotavirus strains: implications for rotavirus vaccine programs. *J Infect Dis.* 1;192 Suppl 1:S146-159.

Gouvea V, Santos N, Timenetsky M do C. 1994a. Identification of bovine and porcine rotavirus G types by PCR. *J Clin Microbiol.* 32(5):1338-1340.

Gouvea V, de Castro L, Timenetsky MC, Greenberg H, Santos N. 1994b. Rotavirus serotype G5 associated with diarrhea in Brazilian children. *J Clin Microbiol.* 32(5):1408-1409. Erratum in: *J Clin Microbiol* 32(7):1834.

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

Green KY, Hoshino Y, Ikegami N. 1989. Sequence analysis of the gene encoding the serotype-specific glycoprotein (VP7) of two new human rotavirus serotypes. *Virology.* 168(2):429-433.

Griffin DD, Kirkwood CD, Parashar UD, Woods PA, Bresee JS, Glass RI, Gentsch JR. 2000. Surveillance of rotavirus strains in the United States: identification of unusual strains. The National Rotavirus Strain Surveillance System collaborating laboratories. *J Clin Microbiol.* 38(7):2784-2787.

Hoshino Y, Honma S, Jones RW, Ross J, Santos N, Gentsch JR, Kapikian AZ, Hesse RA. 2005. A porcine G9 rotavirus strain shares neutralization and VP7 phylogenetic sequence

lineage 3 characteristics with contemporary human G9 rotavirus strains. *Virology*. 5;332(1):177-188.

Jin Q, Ward RL, Knowlton DR, Gabbay YB, Linhares AC, Rappaport R, Woods PA, Glass RI, Gentsch JR. 1996. Divergence of VP7 genes of G1 rotaviruses isolated from infants vaccinated with reassortant rhesus rotaviruses. *Arch Virol*. 141(11):2057-2076.

Kane EM, Turcios RM, Arvay ML, Garcia S, Bresee JS, Glass RI. 2004. The epidemiology of rotavirus diarrhea in Latin America. Anticipating rotavirus vaccines. *Rev Panam Salud Publica*. 16(6):371-377.

Khamrin P, Peerakome S, Wongsawasdi L, Tonusin S, Sornchai P, Maneerat V, Khamwan C, Yagy F, Okitsu S, Ushijima H, Maneekarn N. 2006. Emergence of human G9 rotavirus with an exceptionally high frequency in children admitted to hospital with diarrhea in Chiang Mai, Thailand. *J Med Virol*. 78(2):273-280.

Kirkwood C, Bogdanovic-Sakran N, Palombo E, Masendycz P, Bugg H, Barnes G, Bishop R. 2003. Genetic and antigenic characterization of rotavirus serotype G9 strains isolated in Australia between 1997 and 2001. *J Clin Microbiol*. 41(8):3649-3654.

Laird AR, Gentsch JR, Nakagomi T, Nakagomi O, Glass RI. 2003. Characterization of serotype G9 rotavirus strains isolated in the United States and India from 1993 to 2001. *J Clin Microbiol*. 41(7):3100-3111.

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

Linhares AC, Verstraeten T, Wolleswinkel-van den Bosch J, Clemens R, Breuer T. 2006. Rotavirus serotype G9 is associated with more-severe disease in Latin America. *Clin Infect Dis.* 1;43(3):312-314.

Maunula L, von Bonsdorff CH. 1998. Short sequences define genetic lineages: phylogenetic analysis of group A rotaviruses based on partial sequences of genome segments 4 and 9. *J Gen Virol.* 79 (Pt 2):321-332.

Martella V, Ciarlet M, Baselga R, Arista S, Elia G, Lorusso E, Banyai K, Terio V, Madio A, Ruggeri FM, Falcone E, Camero M, Decaro N, Buonavoglia C. 2005. Sequence analysis of the VP7 and VP4 genes identifies a novel VP7 gene allele of porcine rotaviruses, sharing a common evolutionary origin with human G2 rotaviruses. *Virology.* 20;337(1):111-123.

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.* 15;346(2):301-311.

Mascarenhas JD, Linhares AC, Gabbay YB, Leite JP. 2002. Detection and characterization of rotavirus G and P types from children participating in a rotavirus vaccine trial in Belem, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 97(1):113-117.

Mascarenhas JD, Linhares AC, Bayma AP, Lima JC, Sousa MS, Araujo IT, Heinemann MB, Gusmao RH, Gabbay YB, Leite JP. 2006. Molecular analysis of VP4, VP7, and NSP4 genes of P[6]G2 rotavirus genotype strains recovered from neonates admitted to hospital in Belem, Brazil. *J Med Virol.* 78(2):281-289.

O'Ryan M, Perez-Schael I, Mamani N, Pena A, Salinas B, Gonzalez G, Gonzalez F, Matson DO, Gomez J. 2001. Rotavirus-associated medical visits and hospitalizations in South America: a prospective study at three large sentinel hospitals. *Pediatr Infect Dis J.* 20(7):685-693.

Page NA, Steele AD. 2004a. Antigenic and genetic characterization of serotype G2 human rotavirus strains from the African continent. *J Clin Microbiol.* 42(2):595-600.

Page NA, Steele AD. 2004b. Antigenic and genetic characterization of serotype G2 human rotavirus strains from South Africa from 1984 to 1998. *J Med Virol.* 72(2):320-327.

Parashar UD, Gibson CJ, Bresse JS, Glass RI. 2006. Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerg Infect Dis.* 12(2):304-306.

Parra GI, Espinola EE. 2006. Nucleotide mismatches between the VP7 gene and the primer are associated with genotyping failure of a specific lineage from G1 rotavirus strains. *Virology.* 25(3):35.

Rubilar-Abreu E, Hedlund KO, Svensson L, Mittelholzer C. 2005. Serotype G9 rotavirus infections in adults in Sweden. *J Clin Microbiol.* 43(3):1374-1376.

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

Santos N, Volotao EM, Soares CC, Albuquerque MC, da Silva FM, de Carvalho TR, Pereira

CF, Chizhikov V, Hoshino Y. 2001. Rotavirus strains bearing genotype G9 or P[9] recovered from Brazilian children with diarrhea from 1997 to 1999. *J Clin Microbiol.* 39(3):1157-1160.

Santos N and Hoshino Y. 2005a. 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.

Santos N, Volotao EM, Soares CC, Campos GS, Sardi SI, Hoshino Y. 2005b. Predominance of rotavirus genotype G9 during the 1999, 2000, and 2002 seasons among hospitalized children in the city of Salvador, Bahia, Brazil: implications for future vaccine strategies. *J Clin Microbiol.* 43(8):4064-4069.

Tajima F and Nei M. 1984. Estimation of evolutionary distance between nucleotide sequences. *Mol Biol Evol* 1(3):269-285.

Volotao EM, Soares CC, Maranhao AG, Rocha LN, Hoshino Y, Santos N. 2006. Rotavirus surveillance in the city of Rio de Janeiro-Brazil during 2000-2004: detection of unusual strains with G8P[4] or G10P[9] specificities. *J Med Virol.* 78(2):263-72.

Wen L, Ushijima H, Kakizawa J, Fang ZY, Nishio O, Morikawa S, Motohiro T. 1995. Genetic variation in VP7 gene of human rotavirus serotype 2 (G2 type) isolated in Japan, China, and Pakistan. *Microbiol Immunol.* 39(11):911-915.

Xin KQ, Morikawa S, Fang ZY, Mukoyama A, Okuda K, Ushijima H. 1993. Genetic variation in VP7 gene of human rotavirus serotype 1 (G1 type) isolated in Japan and China. *Virology.* 197(2):813-816.

Zhou Y, Li L, Okitsu S, Maneeakarn N, Ushijima H. 2003. Distribution of human rotaviruses, especially G9 strains, in Japan from 1996 to 2000. *Microbiol Immunol.* 47(8):591-595.