



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
FACULDADE DE BIOMEDICINA

ANA CAROLINA SILVA SERRA

**GASTRENERITE AGUDA POR ROTAVÍRUS EM CRIANÇAS DA
REGIÃO NORTE DO BRASIL: DETERMINAÇÃO DOS GENÓTIPOS
DE ROTAVÍRUS A EM AMOSTRAS NÃO GENOTIPADAS**

Belém-Pará
2017

Ana Carolina Silva Serra

**GASTRENTERITE AGUDA POR ROTAVÍRUS EM CRIANÇAS DA
REGIÃO NORTE DO BRASIL: DETERMINAÇÃO DOS GENÓTIPOS
DE ROTAVÍRUS A EM AMOSTRAS NÃO GENOTIPADAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
à Faculdade de Biomedicina da Universidade
Federal do Pará, como requisito parcial para
obtenção do grau de Bacharel em
Biomedicina.

Orientadora: Dra. Delana Andreza Melo Bezerra

BELÉM-PARÁ

2017

Ana Carolina Silva Serra

**GASTRENTERITE AGUDA POR ROTAVÍRUS EM CRIANÇAS DA
REGIÃO NORTE DO BRASIL: DETERMINAÇÃO DOS GENÓTIPOS
DE ROTAVÍRUS A EM AMOSTRAS NÃO GENOTIPADAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
à Faculdade de Biomedicina da Universidade
Federal do Pará, como requisito parcial para
obtenção do grau de Bacharel em
Biomedicina.

Belém (PA), 01 de fevereiro de 2016

BANCA EXAMINADORA

Dra. Delana Andreza Melo Bezerra
SAVIR-IEC
(orientadora)

Dra. Luana da Silva Soares
SAVIR-IEC

Dra. Jacqueline Cortinhas Monteiro
ICB-UFPA

*“Cada machucado é uma lição e cada lição
nos torna melhor em algo”*

George R.R.Martin

Aos meus pais por nunca deixarem de acreditar em mim, mesmo quando eu não merecia.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pois eu não conseguiria sem eles. Obrigada pelos sacrifícios que fizeram para eu chegar até aqui, só nós sabemos o quanto foi difícil. Espero sempre ser digna da confiança e orgulho de vocês;

Ao meu avô e minhas avós que mesmo sem entender o curso que eu escolhi me apoiaram e sempre ajudaram nos momentos difíceis;

Á minha orientadora, Delana, que sempre foi compreensiva e paciente comigo e, além de orientadora, se tornou uma grande amiga na minha vida;

Ao Ed que foi o primeiro a me acolher no laboratório e sempre estava disposto a me ensinar e tirar todas as minhas dúvidas;

Ao Dr Linhares e á Dra Joana Mascarenhas que me aceitaram e acolheram no seu grupo de pesquisa;

Á Dra. Maria Cleonice por me dar a oportunidade do estágio no laboratório de Rotavirus;

Á todos da família Rotavírus, pois todos me ajudaram de alguma forma e foram importantes de alguma maneira na minha vida;

Á você, Filósofa, por sempre me apoiar e me dar os melhores conselhos. Como você sempre fala “nesse mundo injusto, encontrei alguém que ameniza tudo”;

Ás “gordianes” por tornarem esses quatro anos inesquecíveis, nós sofremos, choramos, ficamos sem dormir, mas no final sempre acabávamos juntas, rindo na beira do rio. Esses momentos estarão para sempre na minha memória.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
1.1. ASPECTOS GERAIS	8
1.2. ROTAVÍRUS.....	9
1.3. BIOSÍNTESE VIRAL	12
1.4. PATOGÊNESE E QUADRO CLÍNICO	13
1.5. VARIABILIDADE GENÉTICA.....	14
1.6. EPIDEMIOLOGIA	15
1.7. VACINA	17
2. OBJETIVOS	18
2.1. OBJETIVO GERAL	18
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3. METODOLOGIA	18
3.1. ASPECTOS ÉTICOS	18
3.2. MATERIAL.....	19
3.3. MÉTODOS	19
3.3.1. Preparo de suspensão fecal e extração do RNA viral	19
3.3.2. Determinação dos genótipos G e P	20
3.3.3. Sequenciamento de nucleotídeos	22
3.3.4. Análise das sequências	23
4. RESULTADOS	23
5. DISCUSSÃO	27
6. CONCLUSÃO	29
7. REFERÊNCIAS	29

LISTA DE ABREVIATURAS

aa - Aminoácidos

BEL - Bélgica

cDNA - DNA Complementar

df-RNA - Dupla Fita de Ácido Ribonucleico

EUA - Estados Unidos da América

GA - Gastreenterite Aguda

IEC - Instituto Evandro Chagas

IgA - Imunoglobulina de Classe A

IgG - Imunoglobulina de Classe G

IgM - Imunoglobulina de Classe M

NSP - Proteína Não-Estrutural

OMS - Organização Mundial de Saúde

pb - Pares de Bases

PCR- Reação em Cadeia da Polimerase

PIN - Programa de Imunização Nacional

RNA - Ácido Ribonucleico

RT-PCR - Reação em Cadeia da Polimerase Precedida de Transcrição Reversa

RV - Rotavírus

RV-A - Rotavirus da Espécie A

SRO - Sais de Reidratação Oral

TRO - Terapia de Reidratação Oral

UNICEF - Fundo das Nações Unidas para a Infância

VP - Proteína Estrutural

RESUMO

Rotavírus da espécie A (RVA) é o principal agente viral associado a casos de gastroenterite aguda (GA) em crianças da primeira infância e sua classificação binária é baseada nas proteínas do seu capsídeo externo, VP7 e VP4, as quais denominam os tipos G e P, respectivamente. Atualmente, são descritos 32 genótipos G e 47 P, sendo G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8], G9P[8] e G12P[8] as combinações binárias mais detectadas mundialmente e as demais combinações menos frequentes são classificadas como não usuais. Entretanto, ainda que se tenha conhecimento dos tipos usuais e não usuais circulantes, existe um número considerável de amostras não tipadas havendo a necessidade de determinação dos genótipos em amostras com essa característica. O objetivo do trabalho foi determinar os tipos G e P de amostras de RVA não genotipadas, obtidas de crianças com GA na região norte do Brasil, no período pré e pós a introdução da vacina no calendário nacional de imunização. Os espécimes clínicos analisados foram provenientes de estudos desenvolvidos no Instituto Evandro Chagas (IEC) referentes a três projetos de pesquisa conduzidos no período de 2003 a 2012 em que foram selecionadas 40,8% (87/213) das amostras não genotipadas. Após o preparo das suspensões fecais o genoma viral foi extraído e submetido a amplificação e sequenciamento de nucleotídeos. Foi possível genotipar 51,8% (45/87) das amostras, sendo 23 do período pré vacina (2003-2006) e 22 pós vacina. Os tipos mais frequentes detectados no período pré vacinal foram: G9P[8] (8/23, 34,8%), G1P[8] (5/23, 21,7%), G12P[9] (3/23, 13%), G1P[9] (2/23, 8,7%), G12P[8] (2/23, 8,7%), G12P[9] (3/23, 9,1%), G1P[6] (1/23, 4,3%) e G3P[3] (1/23, 4,3%). Já no período pós vacina foram detectados os tipos G2P[4] (7/22, 31,8%), G12P[8] (5/22, 22,7%), G1P[8] (3/22, 13,6%), G3P[6] (3/22, 13,6%), G9P[8] (3/22, 13,6%) e G1P[6] (1/22, 4,5%). Uma amostra foi genotipada como G3P[3] com o P[3] relacionado filogeneticamente com cepas caninas e felinas. O estudo em amostras não tipadas exibiu como mais prevalente o genótipo G9P[8] no período anterior a vacina e o genótipo G2P[4] no período pós-introdução da vacina. Adicionalmente, houve a detecção da cepa não usual G3P[3] que apresentou o gene VP4 de origem felina e canina. Portanto, a genotipagem de amostras não tipadas é essencial para o controle e vigilância das cepas circulante de RV, assim como para a contínua investigação do padrão evolutivo do RV.

Palavras-chave: Rotavirus; Genotipagem; Não tipadas

ABSTRACT

Rotavirus species A (RVA) is the principal viral agent associated with cases of acute gastroenteritis (AG) in early childhood children and their binary classification is based on its outer capsid proteins, VP7 and VP4, which are called the G and P types, respectively. Currently, 32 genotypes G are described and 47 P, being G1P[8], G2P[4], G3P[8] G4P[8] G9P [8] and G12P [8] the binary combinations most detected worldwide and other combinations less frequently are classified as unusual. However, although there was knowledge of the usual and unusual types circulating, there is a considerable number of untyped samples, hence the need for determination of the genotypes in samples with this characteristic. Determine the G and P types of RVA untyped samples obtained from children with AG in the north of Brazil, in the period pre and post the introduction of the vaccine in the national immunization schedule. The clinical specimens analyzed were obtained from studies conducted in the Evandro Chagas Institute (ECI) related to three research projects conducted in the period from 2003 to 2012 in which were selected 40.8% (87/213) of the untyped samples. After the preparation of the faecal suspensions, the viral genome was extracted and subjected to amplification and nucleotide sequencing. It was possible to genotype 51.8 % (45/87) of the samples, being 23 of the pre vaccine period (2003-2006) and 22 post vaccination. The most frequently types detected in the pre vaccination period were G9P[8] (8/23, 34.8%) , G1P[8] (5/23, 21.7%) , G12P[9] (3/23, 13%) , G1P[9] (2/23, 8,7 %) , G12P[8] (2/23, 8.7%) , G12P[9] (3/23, 9.1%) , G1P[6] (1/23, 4.3%) and G3P[3] (1/23, 4.3%) . In the post vaccination period were detected the types G2P[4] (7/22, 31.8%), G12P[8] (5/22, 22.7%), G1P[8] (3/22, 13.6%), G3P[6] (3/22, 13.6%) G9P[8] (3/22, 13.6%) and G1P[6] (1/22, 4.5%). The sample 143 had its P type grouped as P[3] and showed similarity with canine and feline strains and its G type was genotyped as G3 by Seminested -PCR resulting in the unusual binary combination G3P[3]. Reescrever de acordo com o resumo em portugThe study on not typed samples exhibited as more prevalent the G9P[8] genotype in the period preceding the vaccine and the G2P[4] genotype in the period after introduction of the vaccine. In addition, there was the detection of the not usual G3P[3] strain that showed the VP4 gene from feline and canine origin. Therefore, the genotyping of untyped samples is essential for the control and surveillance of circulating strains of RV, as well as to the continuous investigation of the RV evolutionary pattern.

Key words: Rotavirus; genotyping; untyped

1. INTRODUÇÃO

1.1. ASPECTOS GERAIS

A mortalidade infantil representa preocupação no cenário atual, principalmente nos países em desenvolvimento. Neste contexto, a gastroenterite aguda (GA) está entre as cinco principais causas de morte em todo o mundo e acomete principalmente crianças menores de cinco anos de idade (UNICEF, 2015). Existe vários agentes etiológicos que causam GA, tais como bactérias, vírus e parasitas, porém os vírus entéricos são os principais microrganismos causadores da doença (CHITAMBAR et al., 2012).

Dentre os vírus entéricos, o rotavírus da espécie A (RV-A) é o principal associada a GA em crianças menores de 5 anos de idade. O uso das vacinas licenciadas para rotavírus culminou com a significativa redução no impacto da doença, no entanto, ainda ocasiona 215.000 mortes anualmente. O maior número de morte ocorreu na África subsaariana, onde verificou-se uma mortalidade de 121.000 indivíduos anualmente, correspondendo por aproximadamente 56% das mortes por RV em todo o mundo. Na América Latina o número de óbitos por RV-A diminuiu de 11.631 no ano de 2000 para 2.288 em 2013 (TATE et al., 2016).

A diversidade genômica exibida pelos RV-A é descrita mundialmente. Existem genótipos que são comumente detectados em escala global, o qual se denomina de genótipos usuais e genótipos que são detectados com menor frequência e/ou emergentes, ditos não usuais (LUCHS e TIMENETSKY, 2014; PATTON, 2012). A detecção dos genótipos ocorre com variada frequência, entretanto, ainda é elevado o número de amostras em que não se obteve o genótipo (amostras não tipadas) (DORÓ et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2012). Estudos de caráter epidemiológico têm sido desenvolvidos registrando a detecção de amostras não tipadas, as quais se tornam objetivos de caracterização genotípica. Portanto, o monitoramento deste tipo de amostra, objeto do presente estudo, é fundamental, pois podem detectar o surgimento de novas variantes genéticas, as quais podem representar um problema quando se trata da imunização para RV-A.

1.2. ROTAVÍRUS

O RV pertence à família *Reoviridae*, gênero *Rotavirus*, é um vírus não envelopado e por isso mais estável no meio ambiente, possui simetria icosaédrica, medindo cerca de 100 nm de diâmetro e uma tripla camada proteica envolvendo o material genético (Figura 1). O genoma do RV é composto por aproximadamente 18.500 pares de bases (pb) e massa molecular de $2,0 \times 10^5$ a $2,0 \times 10^6$ Daltons (Da) e consiste em 11 segmentos de RNA (ácido ribonucleico) de dupla fita (df-RNA), onde cada segmento codifica uma proteína, com exceção do segmento 11 que codifica duas, totalizando 12 proteínas (Figura 2). Estas proteínas são denominadas de estruturais (VP1-VP4, VP6 e VP7) e não estruturais (NSP1-NSP6) (ESTES e GREENBERG, 2013).

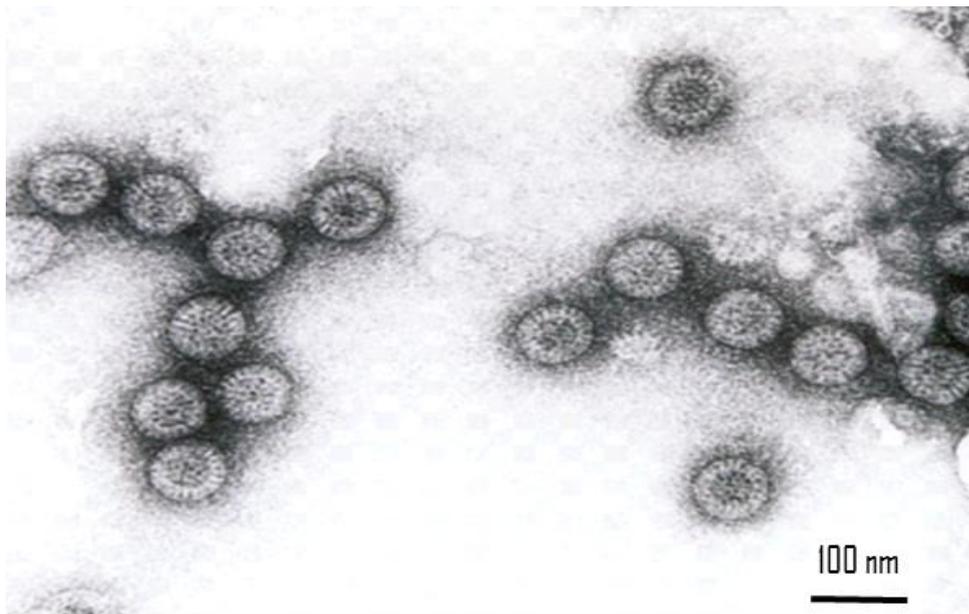


Figura 1: Micrografia eletrônica de contrastação negativa da partícula de rotavírus.

Fonte: Instituto Evandro Chagas

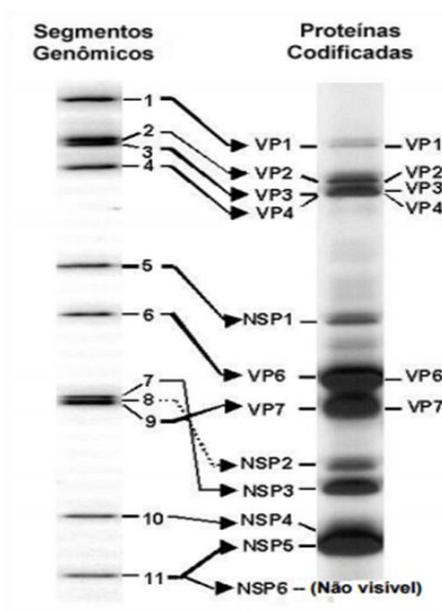


Figura 2: Representação esquemática dos segmentos dos Rotavírus.

Fonte: http://www.reoviridae.org/dsrna_virus_proteins//rotavirus%20figure.htm

O vírion é formado por três camadas proteicas distintas: a camada externa é composta pela proteína VP7 e VP4. A camada intermediária é constituída pela proteína VP6 e a camada mais interna é composta pelas proteínas VP1, VP2 e VP3 (Figura 3) (ESTES e GREENBERG, 2013). A proteína VP2 está associada à camada de VP6 (MCCLAIN et al., 2010), o que confere a partícula viral maior homogeneidade morfológica e estabilidade por longo prazo sugerindo assim que a maior responsável pela integridade da estrutura da partícula de RV é a proteína VP6.

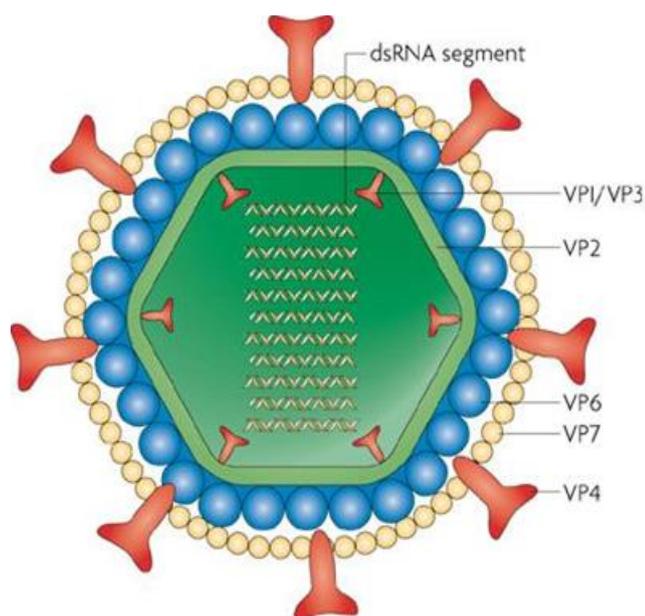


Figura 3: Estrutura esquemática do vírion do RV

Fonte: Angel, 2007

Baseado na proteína VP6, o RV pode ser classificado em 8 espécies ou grupos, A-H (ICTV, 2017). No entanto, recentemente foram descritas as espécies I e J (BÁNYAI et al., 2016; MIHALOV-KOVÁCS et al., 2015). Entre esses grupos, o RV-A é o mais frequente, pois é o mais prevalente na natureza e, portanto, responsável pela maioria das infecções nos seres humanos e animais.

As proteínas VP7 e VP4 classificam o RV em genótipos G (glicoproteína) e P (sensível a protease), respectivamente. Até o momento foram descritos 32 genótipos G e 47 P (KULEUVEN, 2016). A camada proteica mais externa é denominada de capsídeo externo, formado por 260 trímeros da proteína VP7 e 60 espículas de trímeros da proteína VP4, sendo que esta última ao sofrer clivagem proteolítica pela tripsina resulta na formação dos peptídeos VP5* e VP8*.

A VP4 é codificada pelo segmento 4 e faz parte do capsídeo externo, é uma proteína não glicosilada que apresenta 87 kDa, com 2.362 nt e 776 aa. É clivada por ação da enzima proteolítica tripsina, dando origem a um fragmento N- terminal VP8*, e um fragmento C-terminal VP5*, processo este que confere a esta proteína uma função determinante para a entrada do vírus na célula hospedeira (Figura 4). Esta proteína tem importante papel na aderência e penetração do vírus e também está implicada na hemaglutinação, neutralização e virulência. Até o momento, tem-se o conhecimento de cinco epítomos de neutralização dentro da subunidade VP8* da proteína VP4, localizados nas posições aminoacídicas M1-L10, I35 R44, I55-D66, V115-G123 e L223-P234 (ESTES e GREENBERG, 2013).

A VP7 é uma glicoproteína e a segunda mais abundante, constituindo aproximadamente 30% do vírion. Apresenta massa molecular de 34 kDa e 326 aa. É o principal componente do capsídeo externo e possui papel importante na indução de anticorpos neutralizantes sendo responsável pela determinação de sorotipo específico G. Foram descritas 9 regiões antigênicas variáveis (VR) denominadas de VR1 a VR9, por comparação de sequências deduzidas por aa. As regiões VR5, VR7 e VR8 são responsáveis pela codificação de epítomos neutralizantes. O sítio antigênico mais imunogênico da VP7 é a região C que está localizada entre os resíduos de aa 208 e 221, a região A está entre os resíduos de aa 87 e 101 e a região B entre os resíduos de aa 143 e 153 (ESTES e GREENBERG, 2013).

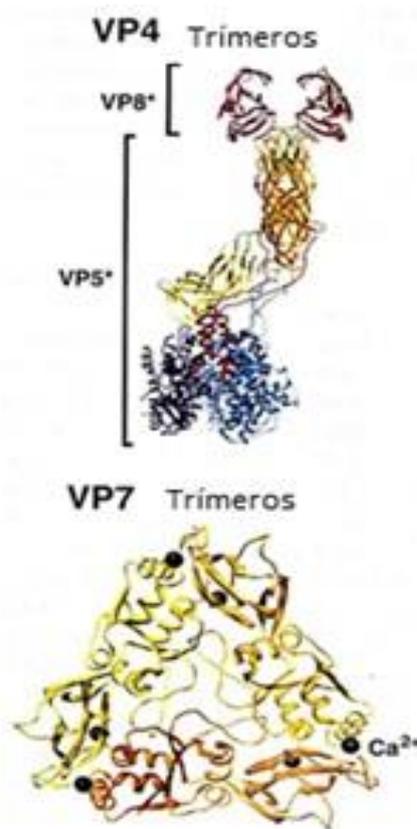


Figura 4: Representação da proteína VP4 e VP7
Fonte: Adaptado de ESTES e GREENBERG, 2013.

1.3. BIOSÍNTESE VIRAL

A replicação viral ocorre no intestino delgado dos seres humanos e animais, mais especificamente na região do jejuno em células absorptivas denominadas de enterócitos. O intestino delgado possui dois tipos de células: enterócitos e células da cripta, porém o RV tem tropismo pelos enterócitos, sendo esta a célula infectada. O RV possui um ciclo viral lítico e, portanto, causa a destruição e descamação dos enterócitos causando a perda temporária da capacidade absorptiva do intestino, levando ao quadro diarreico (ESTES e GREENBERG, 2013).

A adsorção ocorre através da proteína VP4 que sofre clivagem proteolítica pela tripsina pancreática e dá origem aos domínios VP8* e VP5*. Na fase inicial ocorre a interação de receptores contendo ácido siálico e posteriormente com coreceptores de integrinas. O domínio VP8* interage com o ácido siálico e o domínio VP5* interage com os coreceptores de integrinas (ESTES e GREENBERG, 2013).

A etapa de entrada do vírus da célula é explicada por dois mecanismos: no primeiro, a penetração ocorre diretamente pela membrana celular acarretando na liberação de partículas virais com dupla camada proteica (DLP) e o segundo mecanismo envolve uma endocitose dependente de dilamina, em que as partículas são internalizadas em vesícula endossomal. Esta internalização é dependente da concentração de Ca^{++} intracelular, ocorrendo o desnudamento, perda do capsídeo externo, e em seguida a liberação do cerne no citoplasma celular e as etapas de transcrição, tradução, replicação e maturação viral são iniciadas (ESTES e GREENBERG, 2013).

O complexo de polimerase viral VP1+VP2 inicia a etapa de transcrição resultando na produção de mRNA para a formação das proteínas virais e para servir de molde para a síntese da fita negativa. Cada segmento genômico é transcrito de forma independente e a maioria das proteínas virais são transcritas em ribossomos livres, com exceção da VP7 e NSP4 que são transcritas em ribossomos presentes na membrana o retículo endoplasmático (RE) (ESTES e GREENBERG, 2013).

A proteína NSP5 se associa com a proteína NSP2 para formar o viroplasma, sequestrando RNA^+ e as proteínas do capsídeo, dando início a montagem das partículas. Os RNA^+ que foram sequestrados são empacotados pela VP2 e replicados pela VP1, formando a dupla fita. Posteriormente, a proteína VP6 envolve o core viral que é constituído pelo df-RNA e pelas proteínas VP1, VP2 e VP3, formando a partícula viral incompleta com dupla camada proteica (ESTES e GREENBERG, 2013).

A DLP deixa o viroplasma e ao passar no interior do RE adquire a VP4 e um envelope viral temporário, posteriormente este envelope é removido e a VP7 é adicionada para completar a partícula viral que pode ser liberada pela célula por lise celular ou por exocitose (ESTES e GREENBERG, 2013).

1.4. PATOGÊNESE E QUADRO CLÍNICO

Indivíduos infectados por RV excretam cerca de 10^{12} partículas virais nas fezes e, por ser um vírus não envelopado, estas partículas podem sobreviver por dias no meio ambiente. O pico máximo de excreção do RV ocorre entre o 3^o e 4^o dia após o início dos sintomas, sendo necessário apenas 10 partículas virais íntegras para causar infecção no hospedeiro humano. A principal forma de transmissão do RV é pela via fecal-oral, entretanto existem outros possíveis vias de transmissão, como a via respiratória e através de fômites (SANTOS, 2015; ESTES e GREENBERG, 2013).

Após a transmissão, o sucesso no estabelecimento da infecção está associado basicamente a três fatores imprescindíveis: a dose infectante necessária para iniciar a infecção; os sítios iniciais da replicação acessível, susceptível e permissivo e a ineficiência dos mecanismos de defesa local do hospedeiro (SANTOS, 2015).

Após a penetração nos enterócitos, ocorre a eliminação de partículas virais no sentido do lúmen intestinal, havendo substituição de tais células por enteroblastos que migram das criptas intestinais, as quais têm capacidade de absorção reduzida. As alterações morfológicas resultantes da ação lítica viral incluem a metaplasia epitelial vilositária, hiperplasia das criptas, dilatação mitocondrial, além de moderada infiltração mononuclear da lâmina própria. A diarreia secretora é ocasionada pela enterotoxina NSP4 do RVA que aumenta os níveis intracelulares de Ca^{++} desestabilizando a permeabilidade da membrana plasmática, promovendo o aumento da passagem de água e íons Cl^{-} para dentro do lúmen e o processo inflamatório da submucosa (ESTES e GREENBERG, 2013).

Existe dois tipos de infecção por RV, a assintomática e a sintomática, sendo que esta última pode ser de intensidade moderada ou grave. O período de incubação do vírus varia de dois a quatro dias, podendo evoluir para vômito, febre e diarreia aquosa que pode ter duração de cinco a oito dias e causar desidratação (ESTES e GREENBERG, 2013). A doença é influenciada por fatores virais e do hospedeiro. Dentre os fatores relacionados aos vírus tem sido descrita a virulência multigênica associada aos genes 3, 4, 5, 9 e 10. Em relação aos fatores associados ao hospedeiro, o mais importante é relacionado à idade (SANTOS, 2015; ESTES e GREENBERG, 2013).

1.5. VARIABILIDADE GENÉTICA

A grande diversidade genética do RV é mundialmente conhecida (DÓRÓ et al., 2014; LEITE et al., 2008) e pode ser explicada pelo seu genoma segmentado, que permite ao vírus apresentar mecanismos de evolução, tais como: mutações pontuais, recombinação intramolecular, rearranjo genético e transmissão interespecíes.

Mutações pontuais são substituições, inserções ou deleções de nucleotídeos no genoma do vírus e podem ser sinônimas, ou seja, não ocasionam mudanças nos aminoácidos e, conseqüentemente, na proteína ou podem ser não sinônimas e ocasionar mudanças na sequência de aminoácidos de uma proteína, alterando a sua função e fornecendo uma vantagem evolutiva ao vírus ou levando a uma perda de função, podendo ser acumuladas e

transmitidas a novas progênes virais (DE GRAZIA et al., 2015; DESSELBERGER, 2014; IANIRO et al., 2013). Estas alterações podem dar origem a novas linhagens ou sublinhagens, as quais podem causar surtos e assumir uma importância epidemiológica (ITURRIZA-GÓMARA et al., 2001; MAUNULA e VON BONSDORFF, 1998).

A recombinação (*recombination*) ocorre entre partes de segmentos homólogos a partir de diferentes cepas de RV. A recombinação intrasegmentar tem sido relatada entre epítomos dos domínios antigênicos da proteína VP7 (PHAN et al., 2007), entretanto a frequência destes eventos e as implicações evolucionárias não são claras e não se sabe se estes eventos de recombinação levam a transmissão sustentada.

Os rearranjos genéticos (*rearrangements*) são alterações na sequência de nucleotídeos de segmento genômico individual ocasionadas por deleção ou principalmente duplicação, resultante de erros no momento da transcrição. Consistem em formas especiais de recombinação (DESSELBERGER, 2014).

Reestruturação ou *reassortment* é a permuta de um ou mais segmentos entre dois ou mais vírus da mesma ou de diferentes espécies de hospedeiros que ocorre após a coinfeção (ITURRIZA-GÓMARA et al., 2001). Vários estudos tem comprovado que esta é uma das principais causa de evolução do RV e que está relacionada com a transmissão zoonótica (PAPP et al., 2013; MARTELLA et al., 2010; TODD et al., 2010). O *ressortment* entre cepas de origem humana e de animais é possível devido a alta diversidade das cepas circulantes de RV e a natureza segmenta do genoma viral (MIDGLEY et al., 2014; GHOSH e KOBAYASHI, 2012), provocando o surgimento de novas linhagens de RV e contribuindo para a variabilidade genética do vírus na natureza.

1.6. EPIDEMIOLOGIA

A infecção por RV-A ocasiona 215.000 mortes anualmente (TATE et al., 2016) e este vírus é descrito como um dos principais agentes causadores de GA em crianças menores de 5 anos de idade (LIU et al., 2014). A taxa de detecção de RV no mundo diminuiu de 42,5% no ano de 2000 para 37,3% em 2013 (TATE et al., 2016). Em 2013, cerca da metade das mortes causadas por RV foram provenientes de quatro países, Índia, Nigéria, Paquistão e República Democrática do Congo e 56% de todos os óbitos causados por RV ocorreram na África Subsaariana (TATE et al., 2016).

A infecção por RV geralmente está relacionada a seis genótipos que podem ser classificados como usuais: G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8], G9P[8] e G12P[8] que representam de 80% a 90% das infecções em todo o mundo e as demais combinações podem ser classificadas como não usuais, infecções mistas ou amostras não tipadas (DORÓ et al., 2014). Durante o período de 1990 e 2000 os tipos G9P[8] e G12P[8] emergiram em todo o mundo e atualmente são, respectivamente, a 5^o e 6^o cepa de RV mais frequente mundialmente (BUCARDO et al., 2015).

O genótipo G1P[8] foi o mais prevalente em todos os continentes, com exceção do continente Americano que apresentou o genótipo G2P[4] como o mais comum NO PERÍODO DE 2008 a 2012 (DORÓ et al., 2014). Além desses genótipos usualmente encontrados em todo o mundo, existe algumas cepas que possuíram uma importância local e/ou regional, como a cepa G5P[8] na América do Sul e G8P[6] em algumas partes da África (ALFIERI et al., 1996; CUNLIFFE et al., 2010).

Infecções por múltiplos genótipos de RV e amostras não tipadas representam, respectivamente, 3,8% e 6,1% das amostras em todo o mundo. As amostras não tipadas são mais frequentes em países em desenvolvimento, como a África (10,7%), continente Americano (4,2%) e continente Asiático (12,9%) (BÁNYAI et al., 2012). Os genótipos não usuais são menos frequentes e representam cerca de 11,9% das infecções em todo o mundo (DORÓ et al., 2014)

Na África, foram detectados sete genótipos não usuais com uma frequência maior do que 1%, são eles: G2P[6] (8,2%), G1P[6] (6%), G3P[3] (5,5%), G12P[6] (3,5%), G8P[6] (1,7%), G8P[4] (1,8%), G1P[4] (1,1) (DORÓ et al., 2014). Na Guatemala e em Bangladesh foi detectado o genótipo G9P[4] nos anos de 2010 e 2011 respectivamente (QUAYE et al., 2013; AFRAD et al., 2013), o genótipo G12P[6] no Nepal e Malawi, G1P[6] e G2P[6] foram detectados por alguns anos na Colômbia, Iraque e Gâmbia (PELÁEZ-CARVAJAL et al., 2014; AHMED et al., 2013; ANSARI et al., 2013; GAUCHAN et al., 2013).

No Norte do Brasil o genótipo mais frequente entre 2006 a a 2012 foi o G2P[4] (OLIVEIRA et al., 2012; JUSTINO et al., 2011; MASCARENHAS et al., 2010). Detectou-se também o genótipo não usual G12P[6] no período de 2008 á 2010 (SOARES et al., 2012). No ano de 2013, o G12P[8] emergiu como o mais prevalente e recentemente o genótipo G3P[8] de origem equina emergiu nesta região, sendo responsável por 80% dos casos de infecção por RVA (GUERRA et al., 2016). Entretanto, no Nordeste brasileiro houve o predomínio do tipo G1P[8], seguido do G2P[4], além da detecção dos genótipos não usuais G3P[8], G8P[4], G1P[4], G1P[6], G2P[6], G8P[6] no período de 2006 á 2012 (GURGEL et al., 2014).

Mesmo que se tenha conhecimento de amostras usuais e não usuais, existe cerca de 5,2% de amostras não genotipadas mundialmente (Dóro et al., 2014) isto pode ocorrer devido a diversidade genética do RV. A genotipagem dessas amostras é essencial para a vigilância epidemiológica das cepas de RV circulantes depois da introdução da vacina no calendário de imunização nacional (2006) e para se obter conhecimentos acerca da diversidade genética do RV.

1.7. VACINA

O impacto na saúde infantil causado pela infecção por RV e a diversidade genética apresentada por esse agente forneceram o estudo e desenvolvimento de várias vacinas objetivando minimizar a mortalidade e a morbidade causada pelo RV. Atualmente duas vacinas foram implantadas e distribuídas mundialmente, são elas a Rotarix® da GlaxoSmithKline Biologicals (BEL) que é uma vacina monovalente, de origem humana, atenuada que está no programa nacional de imunização (PNI) do Brasil desde 2006 e a Rotateq® da Merck and Company (EUA) que é uma vacina pentavalente recombinante, de origem bovina-humano. A OMS recomenda a utilização das duas vacinas para a imunização de rotina de todas as crianças.

A eficácia das vacinas variou de 80% a 98% em países industrializados, incluindo a América Latina (VESIKARI et al., 2006, 2007; RUIZ-PALACIOS et al., 2006) e entre 39% a 77% em países em desenvolvimento, como os da África e Ásia (ARMAH et al., 2010; MADHI et al., 2010; ZAMAN et al., 2010). A Rotarix® é uma amostra de genótipo G1P[8] de origem humana, com vírus atenuado por passagem em série em células de rim de macaco verde africano (VERO). A vacina deve ser aplicada em duas doses, a primeira na sexta semana de vida e a segunda deve ser administrada em um intervalo de quatro semanas após a primeira dose. Essa vacina foi testada na Finlândia, América Latina (Brasil, México e Venezuela) e Cingapura obtendo eficácia de até 85% contra episódios graves de GA por RV (RUIZ-PALACIOS et al., 2006).

Na América Latina a eficácia da vacina monovalente foi de 80,5% contra GA causada por RV, causando uma proteção de 82,7% contra o genótipo G1P[8] e de 38,6% para o genótipo G2P[4] (O'RYAN; LINHARES, 2009). Em Belém (PA), a Rotarix® foi introduzida no PNI em 2006 e ocasionou uma eficácia de 86% contra gastroenterite graves e diminuiu em 93% as hospitalizações causadas por RV, além de apresentar uma proteção de 92% para o

genótipo G1P[8] (proteção homologa) e de 87% para outros genótipos (proteção heteróloga), ressaltando uma menor eficácia para o tipo G2P[4] (41%) (LINHARES et al., 2006).

Até o período de maio de 2016, 81 países incluíram a vacina monovalente no seu PNI (PATH, 2016), portanto estudos de monitoramento das cepas circulantes após a introdução da vacina são necessários para se obter mais informações acerca do impacto da vacina contra o RV e o resultado da pressão seletiva que a vacina causou nas cepas circulantes de RV (BABJI et al., 2014; PATEL et al., 2011).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL: Caracterização genotípica de amostras de rotavírus não genotipadas, obtidas de crianças com gastroenterite aguda por rotavírus na região norte do Brasil.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar os genótipos G (VP7) e/ou P (VP4) das amostras não genotipadas de rotavírus;
- Verificar a ocorrência de genótipos não usuais em amostras não genotipadas;
- Analisar filogeneticamente os genes que codificam as proteínas VP7 e/ou VP4, comparando as sequências de nucleotídeos e aminoácidos com outras descritas no Brasil e no mundo.

3. METODOLOGIA

3.1. ASPECTOS ÉTICOS

Este trabalho é parte do projeto intitulado: “GASTROENTERITE AGUDA POR ROTAVÍRUS EM CRIANÇAS DA REGIÃO NORTE DO BRASIL: ANÁLISE DE INFECÇÃO MISTA E GENOTIPOS NÃO USUAIS” aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos do Instituto Evandro Chagas, Secretaria de Vigilância em Saúde sob o número 579.295.

3.2. MATERIAL

Os espécimes clínicos analisados no trabalho foram obtidos de crianças ≤ 5 anos de idade com gastroenterite aguda pertencentes à região norte, provenientes de estudos desenvolvidos no Instituto Evandro Chagas (IEC) e conduzidos no período anterior a introdução da vacina no calendário de imunização nacional, Projeto RIX 44-14 006 (2001 a 2003) e Projeto Vigilância Epidemiológica 023 (2003); e de projetos desenvolvidos no período posterior a introdução da vacina: Projeto Rede de Vigilância (2006 a 2012). (Figura 3). Foram selecionadas 25 (100%) amostras do projeto Rix 44-14, 20 (18,9%) amostras do projeto Vigilância 003 e 42 (79,2%) amostras do projeto Rede de Vigilância. (Quadro 1).

Projeto	Período	n de Amostras	+RV	n de amostras não genotipadas	n de amostras selecionadas
Rix 44-14 (006)	2001-2003	745	132	25	25 (100%)
Vigilância 003	2003	762	343	135	20 (14,8%)
Rede de Vigilância	2006-2012	1979	825	53	42 (79,2%)

Quadro 1: Estudos desenvolvidos no Instituto Evandro Chagas participantes do trabalho.

3.3. MÉTODOS

3.3.1. Preparo de suspensão fecal e extração do RNA viral

Suspensões fecais a 10% em tampão Tris-Cálcio 0,01M, pH 7,2, foram preparadas. Para tal, aproximadamente 1 g de fezes da amostra selecionada foi adicionado à 1 ml de tampão Tris-Cálcio, e homogeneizado por aproximadamente 10 segundos em vórtex. Em seguida, foi realizada centrifugação a 5000 Xg durante 10 minutos. O sobrenadante foi então coletado e estocado a -20°C para realização das etapas subsequentes.

A partir das suspensões fecais, o genoma viral foi extraído segundo o método descrito por Boom et al. (1990). Em tubos de 1,5 mL foram adicionados 300 μl de suspensão fecal, seguido de 20 μl de Proteinase K (20 mg/mL) e 800 μl de tampão L6. Este conteúdo foi então homogeneizado em vórtex e incubado a 56°C em banho-maria por 10 minutos.

Posteriormente, foram acrescentados 200 μl de etanol absoluto (4°C) e 20 μl de sílica. Após agitação em vórtex por cerca de 10 segundos, o material permaneceu durante 20

minutos em agitador orbital à temperatura ambiente. Ao fim desta etapa, foi realizada centrifugação a 10.000 Xg durante 40 segundos.

O sobrenadante foi então descartado em frasco contendo hipoclorito de sódio (NaOH 10N), e 500 µl de tampão L2 foram adicionados ao tubo, com posterior agitação em vórtex e centrifugação (10.000 Xg, 40 segundos). Novamente o sobrenadante foi descartado, e então 500 µl de etanol 70% (4°C) foram acrescidos, com subsequente agitação em vórtex e centrifugação (10.000 Xg, 40 segundos). Por último houve a adição da acetona P.A., seguida das etapas de homogeneização (em vórtex) e centrifugação (10.000 Xg, 40 segundos).

Finalizado este passo, o sobrenadante foi mais uma vez descartado, e o sedimento direcionado ao banho-maria a 56°C por 15 minutos (mantendo a tampa dos tubos aberta), com intuito de promover sua secagem e evaporação da acetona. Foram adicionados então 40 µl de água ultrapura (livre de DNase e RNase), seguida por homogeneização em vórtex. Os tubos foram novamente submetidos ao banho-maria (56°C por 15 minutos, mantendo as respectivas tampas fechadas), sucedendo-se nova centrifugação (10.000 Xg por 4 minutos). O sobrenadante (correspondente ao ácido nucleico) foi então coletado e transferido para tubos de 200 µl previamente identificados e estocado à -20°C.

3.3.2. Determinação dos genótipos G e P

Após a extração do genoma viral, foi realizado a RT-PCR, que é dividida em duas etapas. A primeira consiste na obtenção da fita do DNA complementar (cDNA) através de transcrição reversa que consiste em 3 µl do ácido nucleico previamente extraído foi adicionado a 1 µl dos pares de iniciadores 4con3/4con2 para o gene *VP4* e Beg9/End9 para o gene *VP7* (Quadro 2) de acordo com o protocolo descrito por Gentsch et al. (1992) e Gouvea et al. (1990), respectivamente. A desnaturação da fita de dsRNA foi executada, por meio de submissão à temperatura de 97°C durante 5 minutos em termociclador, sucedida de choque térmico (banho em gelo a 0°C) por 5 minutos. Após a desnaturação foi adicionada mistura visando à obtenção do DNA complementar (cDNA) por meio de transcrição reversa, durante 1 hora a 42°C (Tabela 1).

Iniciadores	Sequência	Gene	Tamanho do amplicom
4con 3 (+)	TGG CTT CGC CAT TTT ATA GAC A	VP4	875 pb
4con 2 (-)	ATT TCG GAC CAT TTA TAA CC	VP4	
End 9 (+)	GGT CAC ATC ATA CAA TTC TAA TCT AAG	VP7	1062 pb
Beg 9 (-)	GGC TTT AAA AGA GAG AAT TTC CGT CTG G	VP7	

Quadro 2: Sequência dos iniciadores utilizados na RT-PCR para detecção dos tipos G e P de rotavírus.

RT	Quantidade em μL
H ₂ O	16,25
dNTP 25Mm	1
Tampão 10X	2,5
MgCl ₂ 50Mm	1
RT 20U	0,25
Total	21

Tabela 1: Reagentes usados na RT-PCR para a obtenção do cDNA.

Na segunda etapa o cDNA obtido foi submetido a uma amplificação pela PCR, onde foi adicionado uma segunda mistura contendo os reagentes descritos na Tabela 2. Posteriormente, essa mistura foi submetida ao termociclador nas seguintes condições: 1 ciclo de 94°C por 3 minutos (desnaturação inicial), seguido por 35 ciclos de 94°C por 30 segundos (desnaturação), 45°C por 30 segundos (hibridização) e 72°C por 1 minuto (extensão), finalizando com 1 ciclo de 72°C por 10 minutos de extensão final. A seguir, os produtos da RT-PCR foram armazenados a -20°C.

PCR	Quantidade em μL
H ₂ O	20,25
dNTP 25Mm	1
Tampão 10X	2,5
MgCl ₂ 50Mm	1
TAQ 20U	0,25
Total	25

Tabela 2: Reagentes usados na PCR para a amplificação dos genes VP4 e VP7 do RVA.

Os amplicons obtidos na RT-PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corados com Syber Safe® e fotodocumentados no processador de imagem (Gel doc). As amostras positivas na RT-PCR foram encaminhadas para o sequenciamento para se obter os seus genótipos, entretanto as amostras não amplificadas na RT-PCR foram genotipadas pela reamplificação através da técnica de Semi-Nested PCR. Foi realizada uma nova Mix, com a adição de um “pool” de G (iniciadores específicos para G5, G6, G8, G10 e G12) e um “pool” de P (iniciadores específicos para P[1], P[5], P[7], P[10] e P[11]) (GOUVEA et al., 1994a; GOUVEA et al., 1994b; GENTSCH et al., 1992). (Tabela 3)

SEMI-NESTED PCR	Quantidade em μL
H ₂ O	13,25
dNTP 25Mm	2
Tampão 10X	2,5
MgCl ₂ 50Mm	1
RVG9/ 4con3	1
Pool de G/Pool de P	2
TAQ 20U	0,25
Total	22

Tabela 3: Reagentes utilizados na Semi-nested PCR para a determinação dos genótipos G e P das amostras não amplificadas na RT-PCR.

Posteriormente, esse mix foi submetida ao termociclador nas seguintes condições: 1 ciclo de 94°C por 3 minutos (desnaturação inicial), seguido por 30 ciclos de 94°C por 30 segundos (desnaturação), 45°C por 30 segundos (hibridização) e 72°C por 1 minuto (extensão), finalizando com 1 ciclo de 72°C por 10 minutos de extensão final. Os amplicons obtidos na Semi-Nested PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corados com Syber Safe® e fotodocumentados no processador de imagem (Gel doc).

3.3.3. Sequenciamento de nucleotídeos

Os produtos da RT-PCR foram purificados através do QIAquick® PCR purification kit (QIAGEN) e posteriormente sequenciados com os mesmos iniciadores utilizados nas reações de RT-PCR. O sequenciamento foi realizado pelo método de dideoxinucleotídeo em sequenciador automático modelo ABI Prism 3130 (Applied Biosystems). Os produtos foram purificados por precipitação em etanol/isopropanol e ressuspensos em formamida

3.3.4. Análise das sequências

As sequências obtidas para os genes VP7 e VP4 foram alinhadas e editadas utilizando-se o programa BioEdit (V.7.0.5.3) e comparadas com sequências disponíveis no banco de genes “Genbank” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), a partir do programa BLAST. Os dendrogramas foram construídos empregando-se o programa MEGA (v.5.05), pelo método de “Neighbor-Joining”, baseado nos parâmetros de Kimura, (1980), utilizando-se o teste de confiabilidade não paramétrico de “bootstrap” com 2000 réplicas.

4. RESULTADOS

Do total de 87 amostras testadas, 51,7% (45/87) foram genotipadas, sendo 23 do período pré vacina e 22 do período pós vacina. Entre as amostras genotipadas no período anterior a introdução da vacina, observou-se o tipo G9P[8] em 34,8% (8/23), seguido pelo G1P[8] com 21,7% (5/23), G12P[9] com 13% (3/23) e os genótipos G1P[9] e G12P[8] que foram detectados em 8,7% (2/23) das amostras e G1P[6], G3P[3] foram detectadas, cada uma, em apenas um espécime (Tabela 4)

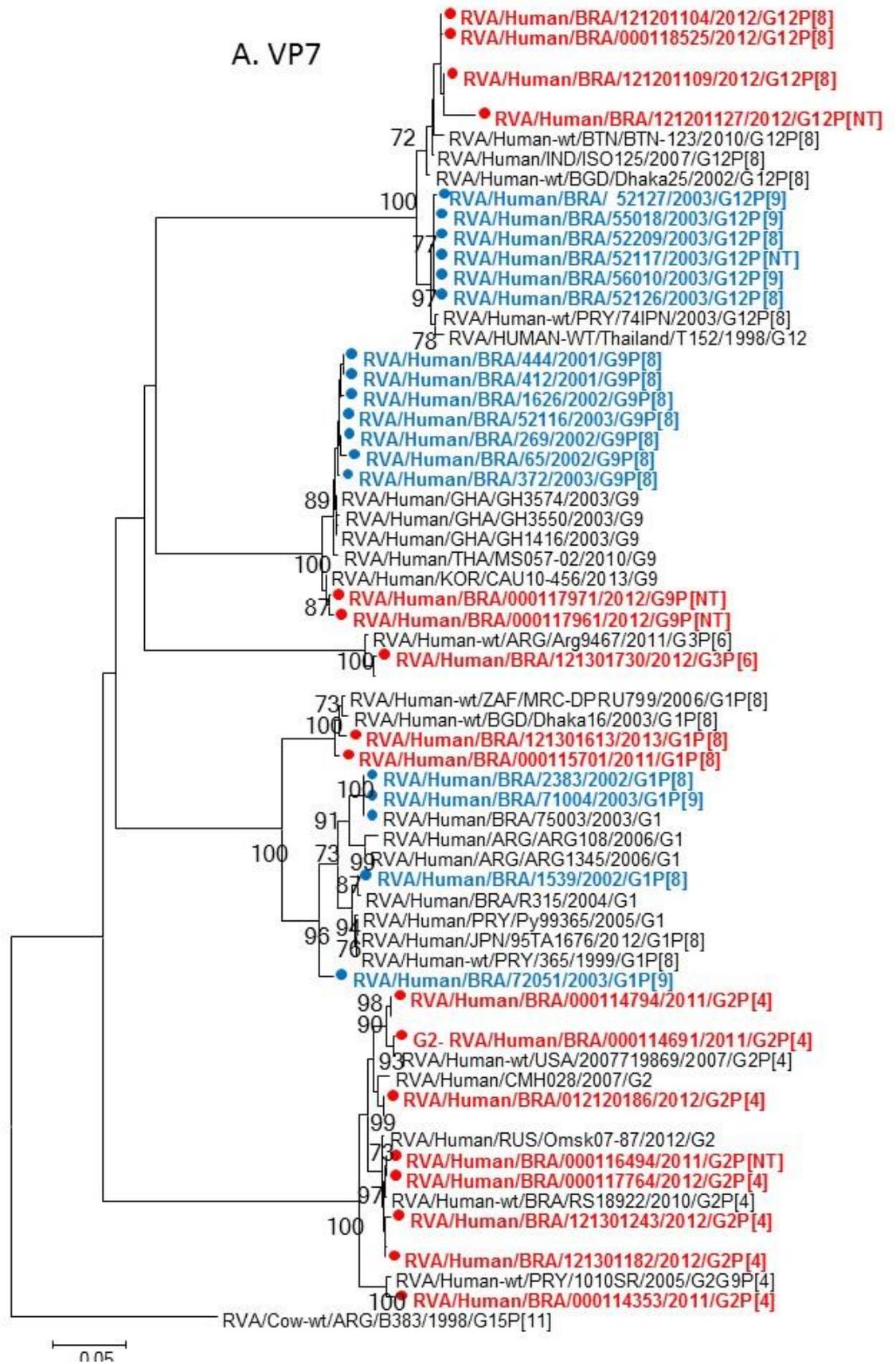
Do total de 22 amostras genotipadas no período anterior a introdução da vacina, 31,8% (7/22) foram tipadas como G2P[4], seguido dos tipos G12P[8] com 22,7% (5/22), G1P[8], G3P[6] e G9P[8] com 13,6% (3/22) e o tipo G1P[6] foi identificado somente em um espécime (Tabela 4)

Período	Tipo P	Tipo G					TOTAL
		G1	G2	G3	G9	G12	
Pré- Vacinal	P[3]	-	-	1	-	-	1
	P[4]	-	-	-	-	-	-
	P[6]	1	-	-	-	-	1
	P[8]	5	-	1	8	2	16
	P[9]	2	-	-	-	3	5
TOTAL		8	-	2	8	5	23
Pós- Vacinal	P[4]	-	7	-	-	-	7
	P[6]	1	-	3	-	-	4
	P[8]	3	-	-	3	5	11
TOTAL		4	7	3	3	5	22

Tabela 4: Determinação dos genótipos de Rotavírus A em amostras não genotipadas do período pré e pós vacinal

Dessas amostras, 35 produtos de PCR do gene VP7 foram sequenciadas e na análise filogenética estas amostras agruparam como G12 (94% a 100%), G9 (98% a 100%), G3 (99% a 100%), G1(90% a 100%) e G2 (98% a 100%). Foram sequenciadas 27 amostras a partir do produto de PCR do gene VP4 e a análise filogenética demonstrou que estas amostras alinharam como P[8] (98% a 100%), P[4] (96% a 100%), P[3] (93% a 98%) e P[9] (99% a 100%)

A amostra 143 teve o seu tipo P seqüenciado e agrupou como P[3] demonstrando uma similaridade a cepas felinas e caninas, e o seu tipo G foi determinado pelo seminested-PCR e foi genotipado como G3 resultando na combinação binária G3P[3] que é descrita na literatura como uma cepa de potencial zoonótico. As demais amostras agruparam com cepas de diversos países como o tipo G9 que agrupou com cepas da Gana, Tailândia e Coreia do Sul, enquanto os tipos P[8] foram similares a cepas do Paraguai, Brasil, Canadá e Bélgica. (Figura 5).



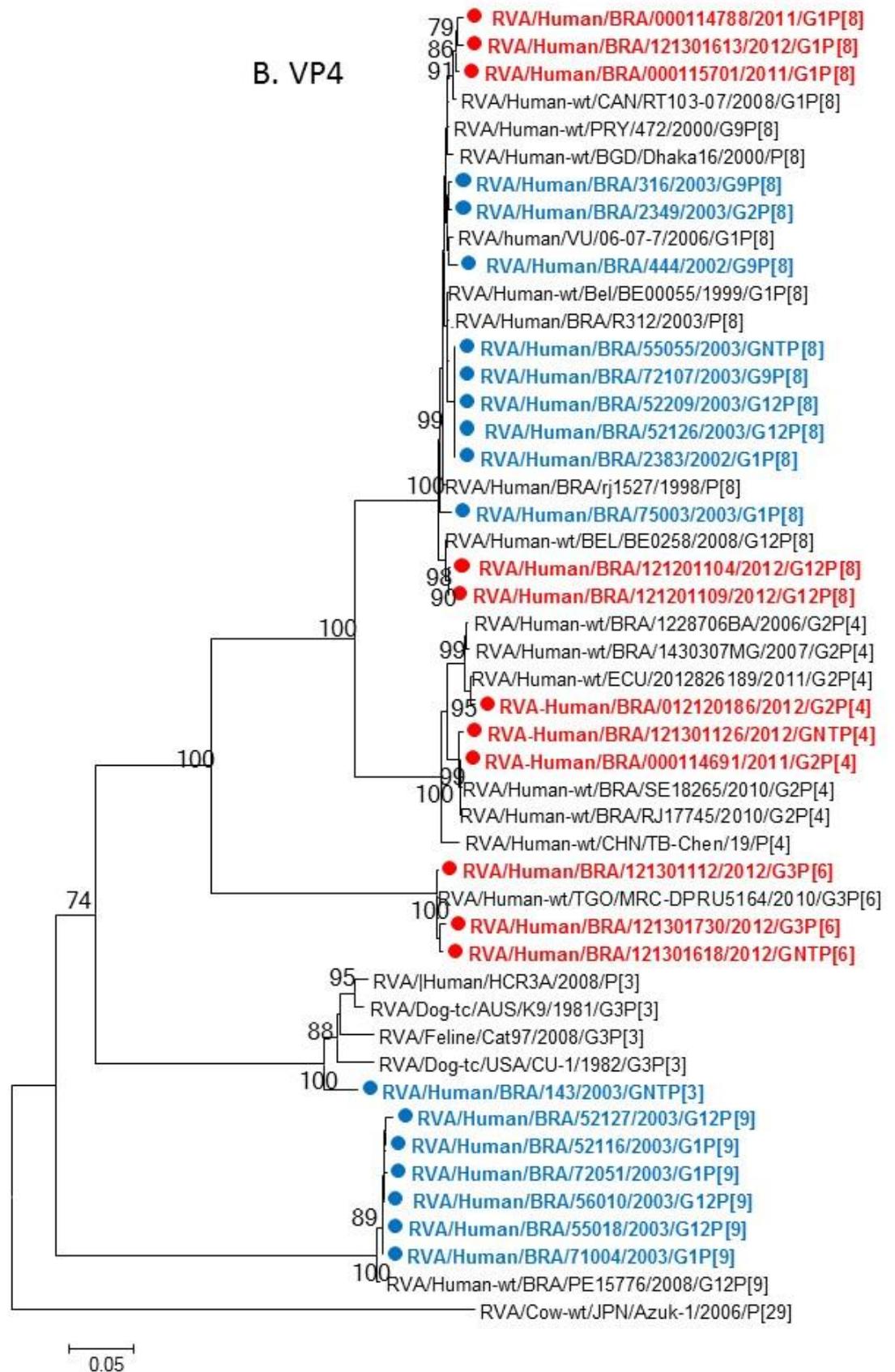


Figura 5: Árvores filogenéticas das sequências nucleotídicas do gene VP7 (A) e VP4 (B). As amostras em azul representam os genótipos do período pré-vacina e as em vermelhos os tipos pós-vacina.

5. DISCUSSÃO

Estudos sugerem a diminuição da frequência de amostras não tipadas, visto que de 1996 a 2007 a prevalência era de 6,1% e no período de 2007 a 2012 foi de 5,2% (DÓRÓ et al., 2014). Este tipo de amostra é mais comum no continente Africano (DÓRÓ et al., 2014; BÁNYAI et al., 2012), isto pode ocorrer devido a grande complexidade da epidemiologia deste continente que apresenta uma alta prevalência de genótipos não usuais, particularidades genotípicas e infecções mistas (DÓRÓ et al., 2014).

A diminuição da frequência de amostras não tipadas pode estar relacionada com a utilização de novas metodologias para caracterização molecular de amostras de RV. Em um estudo na Índia se realizou a genotipagem de amostras não tipadas através de uma combinação de técnicas como a RT-PCR, hibridização e sequenciamento, registrando um percentual de 3% de amostras não tipadas (BABJI et al., 2014). Estudos que utilizam somente a RT-PCR apresentam uma frequência de amostras não tipadas variando de 16% a 65% (SANTOS et al., 2003; ARMAH et al., 2001; JAIN et al., 2001), enquanto que outros estudos que utilizam uma combinação de técnicas para a genotipagem demonstram percentuais variando de 13,6% a 1,5% (CHETRIT et al., 2013; NDZE et al., 2013; HWANG et al., 2012).

As amostras genotipadas no período pré-vacina demonstraram uma alta frequência de G9P[8], isto pode ter ocorrido porque este era um genótipo emergente naquele período (LEITE et al., 2008). Este genótipo foi detectado pela primeira vez na Filadélfia em 1983 e posteriormente se espalhou pelo mundo chegando a representar 79% das cepas circulantes de RV em alguns países da América Latina (HASING et al., 2009). Entre os anos de 1996 e 2007 o G9 era o segundo genótipo mais comum causando infecções, principalmente em combinação com P[8] (BÁNYAI et al., 2012) e em alguns países da América Latina, como Equador e Costa Rica, ele era o genótipo mais prevalente (HASING et al., 2009) tornando-se um dos principais genótipos causador de infecção por RV na última década neste continente.

Neste estudo, o genótipo mais frequente no período posterior a introdução da vacina no calendário de imunização foi o G2P[4], resultado semelhante ao encontrado em outros estudos de vigilância de RV realizados na Nicarágua (BUCARDO e NORDGREN, 2015), no Brasil (ALMEIDA et al., 2015; GURGEL et al., 2014) e Colômbia (COTES-CANTILLO et al., 2014). Atualmente, não está claro se a predominância sustentada de G2P[4] é resultado de uma redução na imunidade heterotípica causada pela vacina monovalente ou se este é um fenômeno natural que ocorre pela flutuação de cepas de RV na população humana (MATTHIJNSSENS et al., 2009).

A genotipagem dessas amostras detectou alguns tipos classificados como não usuais: G1P[6], G1P[9], G3P[6] e G12P[9], estes genótipos tem uma frequência maior em países que estão em desenvolvimento, pois é observado que o RV possui uma maior diversidade e particularidades genéticas nesses locais, o que resulta em uma diminuição na eficácia da vacina, principalmente na África subsaariana e na Ásia (LOPMAN et al., 2012; ARMAH et al., 2010). No continente Africano os genótipos não usuais G1P[6] e G3P[6] possuem uma frequência elevada, 6% e 5,5% respectivamente (DÓRÓ et al., 2014). O tipo G12P[9] foi detectado pela primeira vez na Tailândia há mais de 20 anos, depois na Argentina, no Brasil e Paraguai (MARTÍNEZ et al., 2010; RAHMAN et al., 2007). O genótipo não usual G1P[9] possui uma frequência elevada no Paquistão (3,5%- 6%) (IFTIKHAR et al., 2012) e em menor prevalência na Itália e Taiwan (HWANG et al., 2012).

A análise do gene VP4 da cepa G3P[3] exibiu o relacionamento filogenéticos próximo a cepas de caninos e felinos, corroborando com estudos descritos para G3P[3] onde se observa ser mais comum nestes animais (GERMAN et al., 2015; PAPP et al., 2015; MATTHIJNSSENS et al., 2011). No entanto, o genótipo G3 possui uma serie de hospedeiros, além de humanos, felinos e caninos, sendo isolados também em roedores, equinos, bovinos, suínos e caprinos (EL-ATTAR et al., 2002; VARSHNEY et al., 2002). A sua identificação em amostra humana pode indicar uma possível transmissão interespecie e/ou um reassortment de um ou mais genes, a análise dos outros genes serão necessários para responder a esse questionamento.

Os RV são ubíquos em uma grande variedade de espécies de mamíferos e aves e, em geral, são altamente espécie-específico, entretanto muitas espécies hospedeiras podem abrigar uma variedade de genótipos ao mesmo tempo (MARTELLA et al., 2010). A transmissão zoonótica pode implicar negativamente nos resultados dos programas de vacinação em curso em todo o mundo (DÓRÓ et al., 2015) e o grande potencial zoonótico do RV deve ser mais estudado para se ter mais conhecimentos acerca deste tema e um maior controle e vigilância dos tipos circulantes em animais e nos seres humanos.

6. CONCLUSÃO

O estudo em amostras não tipadas exibiu como mais prevalente o genótipo G9P[8] no período anterior a vacina e o genótipo G2P[4] no período pós-introdução da vacina e a detecção dos genótipos não usuais G1P[6], G1P[9], G3P[6] e G12P[9] nos dois períodos. Adicionalmente, houve a detecção da cepa não usual G3P[3] que apresentou o gene VP4 de origem felina e canina. Portanto, a genotipagem de amostras não tipadas é essencial para o controle e vigilância das cepas circulante de RV, assim como para a contínua investigação do padrão evolutivo do RV.

7. REFERÊNCIAS

- AFRAD, M.H.; HASSAN, Z.; FARJANA, S. et al. Changing profile of rotavirus genotypes in Bangladesh, 2006-2012. **BMC infectious diseases**, **13**: 320-234, 2013.
- AHMED, K.; BOZDAYI, G.; MITUI, M.T. et al. Circulating rotaviral RNA in children with rotavirus antigenemia. **Journal of Negative Results in Biomedicine**, **12**: 1-8, 2013a.
- ALFIERI, A.A.; LEITE, J.P.G.; NAKAGOMI, O. et al. Characterization of human rotavirus genotype P[8]G5 from Brazil by probe-hybridization and sequence. **Archives of Virology**, **141**: 2353-2364, 1996.
- ALMEIDA, T.N.V.; FIACCADORI, F.S.; SOUZA, M. et al. Molecular characterization of group A rotavirus before and after the introduction of vaccines in Brazil. **Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical**, **48**: 599-602, 2015.
- ANGEL, J.; FRANCO, M.A.; GREENBERG, H.B. Rotavirus vaccines: recent developments and future considerations. **Nature Reviews. Microbiology**, **5**: 529-539, 2007.
- ANSARI, S.; SHERCHAND, J.P.; RIJAL, B.P. et al. Characterization of rotavirus causing acute diarrhoea in children in Kathmandu, Nepal, showing the dominance of serotype G12. **Journal of Medical Microbiology**, **62**: 114-120, 2013.
- ARMAH, G.E.; PAGER, C.T.; ASMAH, R.H. et al. Prevalence of unusual human rotavirus strains in Ghanaian children. **Journal of Medical Virology**, **63**: 67-71, 2001.
- ARMAH, G.E.; STEELE, A.D.; ESONA, M.D. et al. Diversity of rotavirus strains circulating in west Africa from 1996 to 2000. **The Journal of Infectious Diseases**, **202**: S64-71, 2010.
- BABJI, S.; ARUMUGAM, R.; SARVANABHAVAN, A. et al. Approach to molecular characterization of partially and completely untyped samples in an Indian rotavirus surveillance program. **Vaccine**, **32**: A84-88, 2014.
- BÁNYAI, K.; KEMENESI, G.; BUDINSKI, I. et al. Candidate new rotavirus species in Schreiber's bats, Serbia. **Infection, Genetics and Evolution**, **48**: 19-26, 2016.
- BÁNYAI, K.; LÁSZLÓ, B.; DUQUE, J. et al. Systematic review of regional and temporal trends in global rotavirus strain diversity in the pre rotavirus vaccine era: insights for understanding the impact of rotavirus vaccination programs. **Vaccine**, **30**: A122-130, 2012.

BOOM, R.; SOL, C.J.; JANSEN, C.L. et al. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**, **28**: 495-503, 1990.

BUCARDO, F.; NORDGREN, J. Impact of vaccination on the molecular epidemiology and evolution of group A rotaviruses in Latin America and factors affecting vaccine efficacy. **Infection, Genetics and Evolution**, **34**: 106-113, 2015.

CHETRIT, E.; L'HOMME, Y.; SOHAL, J.S. et al. Group A rotaviruses in children with gastroenteritis in a Canadian pediatric hospital: The prevaccine era. **The Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology**, **24**: e1-6, 2013.

CHITAMBAR, S.; GOPALKRISHNA, V.; CHHABRA, P. et al. Diversity in the enteric viruses detected in outbreaks of gastroenteritis from Mumbai, Western India. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, **9**: 895-915, 2012.

COTES-CANTILLO, K.; PATERNINA-CAICEDO, A.; CORONELL-RODRÍGUEZ, W. et al. Effectiveness of the monovalent rotavirus vaccine in Colombia: a case-control study. **Vaccine**, **32**: 3035-3040, 2014.

CUNLIFFE, N.A.; NGWIRA, B.M.; DOVE, W. et al. Epidemiology of rotavirus infection in children in Blantyre, Malawi, 1997-2007. **The Journal of Infectious Diseases**, **202**: S168-174, 2010.

DE GRAZIA, S.; GIAMMANCO, G.M.; DÓRÓ, R. et al. Identification of a multi-reassortant G12P[9] rotavirus with novel VP1, VP2, VP3 and NSP2 genotypes in a child with acute gastroenteritis. **Infection, Genetics and Evolution**, **35**: 34-37, 2015.

DESSELBERGER, U. Rotaviruses. **Virus Research**, **190**: 75-96, 2014.

DÓRÓ, R.; FARKAS, S.L.; MARTELLA, V. et al. Zoonotic transmission of rotavirus: surveillance and control. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, **13**: 1337-1350, 2015.

DÓRÓ, R.; LÁSZLÓ, B.; MARTELLA, V. et al. Review of global rotavirus strain prevalence data from six years post vaccine licensure surveillance: is there evidence of strain selection from vaccine pressure?. **Infection, Genetics and Evolution**, **28**: 446-461, 2014.

EL-ATTAR, L.; DHALIWAL, W.; ITURRIZA-GÓMARA, M. et al. Identification and molecular characterization of a bovine G3 rotavirus which causes age-independent diarrhea in cattle. **Journal of Clinical Microbiology**, **40**: 937-942, 2002.

ESTES, M., GREENBERG, H. Rotaviruses. In: FIELDS, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M. (Eds.). **Fields Virology**, 6th ed. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2013. p. 1347-1401.

GAUCHAN, P.; NAKAGOMI, T.; SHERCHAND, J.B. et al. Continued Circulation of G12P[6] Rotaviruses Over 28 Months in Nepal: Successive Replacement of Predominant Strains. **Tropical Medicine and Health**, **41**: 7-12, 2013.

GENEVA. WHO/UNICEF. **Diarrhoea: Why children are still dying and what can be done**. 2009.

- GENTSCH, J.R.; GLASS, R.I.; WOODS, P. et al. Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, **30**: 1365-1373, 1992.
- GERMAN, A.C.; ITURRIZA-GÓMARA, M.; DOVE, W. et al. Molecular epidemiology of rotavirus in cats in the United Kingdom. **Journal of Clinical Microbiology**, **53**: 455-464, 2015.
- GHOSH, S.; KOBAYASHI, N. Whole genomic analysis reveals the porcine origin of human G9P[19] rotavirus strains Mc323 and Mc345. **Infection, Genetics and Evolution**, **12**: 471-477, 2012.
- GOUVEA, V., SANTOS, N.; TIMENETSKY, M.C. VP4 typing of bovine and porcine group A rotaviruses by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, **32**: 1333-1337, 1994a.
- GOUVEA, V., SANTOS, N.; TIMENETSKY, M.C. Identification of bovine and porcine rotavirus G types by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, **32**: 1338-1340, 1994b.
- GOUVEA, V.; GLASS, R.I.; WOODS, P. et al. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, **28**: 276-282, 1990.
- GUERRA, S.F.S.; SOARES, L.S.; LOBO, P.S. et al. Detection of a novel equine-like G3 rotavirus associated with acute gastroenteritis in Brazil. **The Journal of General Virology**, **97**: 3131-3138, 2016.
- GURGEL, R.Q.; ALVAREZ, A.J.; RODRIGUES, A. et al. Incidence of rotavirus and circulating genotypes in Northeast Brazil during 7 years of national rotavirus vaccination. **PloS One**, **9**: e110217, 2014.
- HASING, M.E.; TRUEBA, G.; BAQUERO, M.I. et al. Rapid changes in rotaviral genotypes in Ecuador. **Journal of Medical Virology**, **81**: 2109-2113, 2009.
- HWANG, K.P.; WU, F.T.; BÁNYAI, K. et al. Identification of porcine rotavirus-like genotype P [6] strains in Taiwanese children. **Journal of Medical Microbiology**, **61**: 990-997, 2012.
- IANIRO, G.; HEYLEN, E.; DELOGU. et al. Genetic diversity of G9P[8] rotavirus strains circulating in Italy in 2007 and 2010 as determined by whole genome sequencing. **Infection, Genetics and Evolution**, **16**: 426-432, 2013.
- IFTIKHAR, T.; BUTT, A.; NAWAZ, K. et al. Genotyping of rotaviruses detected in children admitted to hospital from Faisalabad Region, Pakistan. **Journal of Medical Virology**, **84**: 2003-2007, 2012.
- ITURRIZA-GÓMARA, M.; ISHERWOOD, B.; DESSELBERGER, U. et al. Reassortment in vivo: driving force for diversity of human rotavirus strains isolated in the United Kingdom between 1995 and 1999. **Journal of Virology**, **75**: 3696-3705, 2001.

JAIN, V.; DAS, B.K.; BHAN, M.K. et al. Great diversity of group A rotavirus strains and high prevalence of mixed rotavirus infections in India. **Journal of Clinical Microbiology**, **39**: 3524-3529, 2001.

JUSTINO, M.C.A.; LINHARES, A.C.; LANZIERI, T.M. et al. Effectiveness of the monovalent G1P[8] human rotavirus vaccine against hospitalization for severe G2P[4] rotavirus gastroenteritis in Belém, Brazil. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, **30**: 396-401, 2011.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, **16**: 111-120, 1980.

KULEUVEN. Newly Assigned Genotypes, 27 de junho de 2016. Disponível em:<<http://rega.kuleuven.be/cev/viralmetagenomics/virus-classification>> Acesso em: 13 jan. 2017.

LEITE, J.P.G.; CARVALHO-COSTA, F.A.; LINHARES, A.C. Group A rotavirus genotypes and the ongoing Brazilian experience: a review. **Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz**, **106**: 745-753, 2008.

LINHARES, A.C.; VERSTRAETEN, T.; WOLLESWINKEL-VAN DEN BOSCH, J. et al. Rotavirus serotype G9 is associated with more-severe disease in Latin America. **Clinical Infectious Diseases**, **43**: 312-314, 2006.

LIU, L.; OZA, S.; HOGAN, D. et al. Global, regional, and national causes of child mortality in 2000-13, with projections to inform post-2015 priorities: an updated systematic analysis. **Lancet**, **385**: 430-440, 2015.

LOPMAN, B.A.; PAYNE, D.C.; TATE, J.E. et al. Post-licensure experience with rotavirus vaccination in high and middle income countries; 2006 to 2011. **Current Opinion in Virology**, **2**: 434-442, 2012.

LUCHS, A.; TIMENETSKY, M.C.S.T. G8P[6] rotaviruses isolated from Amerindian children in Mato Grosso do Sul, Brazil, during 2009: close relationship of the G and P genes with those of bovine and bat strains. **The Journal of General Virology**, **95**: 627-641, 2014.

MADHI, S.A.; CUNLIFFE, N.A.; STEELE, D. et al. Effect of human rotavirus vaccine on severe diarrhea in African infants. **The New England Journal of Medicine**, **362**: 289-298, 2010.

MARTELLA, V.; BÁNYAI, K.; MATTHIJNSSENS, J. et al. Zoonotic aspects of rotaviruses. **Veterinary Microbiology**, **140**: 246-255, 2010.

MARTÍNEZ, M.; AMARILLA, A.A.; GALEANO, M.E. et al. Predominance of rotavirus G2P[4] and emergence of G12P[9] strains in Asunción, Paraguay, 2006-2007. **Archives of Virology**, **155**: 525-533, 2010.

MASCARENHAS, J.D.; LIMA, C.S.; DE OLIVEIRA, D.S. et al. Identification of two sublineages of genotype G2 rotavirus among diarrheic children in Parauapebas, Southern Pará State, Brazil. **Journal of Medical Virology**, **82**: 712-719, 2010.

MATTHIJNSSENS, J.; BILCKE, J.; CIARLET, M. et al. Rotavirus disease and vaccination: impact on genotype diversity. **Future Microbiology**, **4**: 1303-1316, 2009.

MATTHIJNSSENS, J.; DE GRAZIA, S.; PIESENS, J. et al. Multiple reassortment and interspecies transmission events contribute to the diversity of feline, canine and feline/canine-like human group A rotavirus strains. *Infection*. **Genetics and Evolution**, **11**: 1396-1406, 2011.

MATTHIJNSSENS, J.; HEYLEN, E.; ZELLER, M. et al. Phylodynamic analyses of rotavirus genotypes G9 and G12 underscore their potential for swift global spread. **Molecular Biology and Evolution**, **27**: 2431-2436, 2010.

MAUNULA, L.; VON BONSDORFF, C.H. Short sequences define genetic lineages: phylogenetic analysis of group A rotaviruses based on partial sequences of genome segments 4 and 9. **The Journal of General Virology**, **79**: 321-332, 1998.

MCCLAIN, B.; SETTEMBRE, E.; TEMPLE, B.R.S. et al. X-ray crystal structure of the rotavirus inner capsid particle at 3.8 Å resolution. **Journal of Molecular Biology**, **397**: 587-599, 2010.

MIDGLEY, S.; BÖTTIGER, B.; JENSEN, T.G. et al. Human group A rotavirus infections in children in Denmark: detection of reassortant G9 strains and zoonotic P[14] strains. **Infection, Genetics and Evolution**, **27**: 114-120, 2014.

MIHALOV-KOVÁCS, E.; GELLÉRT, A.; MARTON, S., et al. Candidate new rotavirus species in sheltered dogs, Hungary. **Emerging Infectious Diseases**, **21**: 660-663, 2015.

NDZE, V.N.; PAPP, H.; ACHIDI, E.A. et al. One year survey of human rotavirus strains suggests the emergence of genotype G12 in Cameroon. **Journal of Medical Virology**, **85**: 1485-1490, 2013.

OFFIT, P.A. Rotaviruses: immunological determinants of protection against infection and disease. **Advances in Virus Research**, **44**: 161-202, 1994.

OLIVEIRA, A.; MASCARENHAS, J.D.P.; SOARES, L.S. et al. Rotavirus serotype distribution in northern Brazil trends over a 27 year period pre and post national vaccine introduction. **Trials in Vaccinology**, **1**: 4-9, 2012.

O'RYAN, M.; LINHARES, A.C. Update on Rotarix: an oral human rotavirus vaccine. Expert Review of **Vaccines**, **8**: 1627-1641, 2009.

PAPP, H.; BORZÁK, R.; FARKAS, S. et al. Zoonotic transmission of reassortant porcine G4P[6] rotaviruses in Hungarian pediatric patients identified sporadically over a 15 year period. **Infection, Genetics and Evolution**, **19**: 71-80, 2013.

PATH. Country National Immunization Program (NIP) Introductions of Rotavirus Vaccine, 1 de maio de 2016. Disponível em: < <http://sites.path.org/rotavirusvaccine/files/2016/06/PATH-Country-Introduction-Table-EN-2016.05.01.pdf>> Acesso em: 13 jan. 2017.

PATTON, J.T. Rotavirus diversity and evolution in the post-vaccine world. **Discovery Medicine**, **13**: 85-97, 2012.

PELÁEZ-CARVAJAL, D.; COTES-CANTILLO, K.; PATERNINA-CAICEDO, A. et al. Characterization of rotavirus genotypes before and after the introduction of a monovalent rotavirus vaccine in Colombia. **Journal of Medical Virology**, **86**: 1083-1086, 2014.

PHAN, T.G.; OKITSU, S.; MANEEKARN, N. et al. Evidence of intragenic recombination in G1 rotavirus VP7 genes. **Journal of Virology**, **81**: 10188-10194, 2007.

QUAYE, O.; MCDONALD, S.; ESONA, M.D. et al. Rotavirus G9P[4] in 3 countries in Latin America, 2009-2010. **Emerging Infectious Diseases**, **19**: 1332-1333, 2013.

RAHMAN, M.; MATTHIJNSSENS, J.; YANG, X. et al. Evolutionary history and global spread of the emerging g12 human rotaviruses. **Journal of Virology**, **81**: 2382-2390, 2007.

RAMIG, R.F. Pathogenesis of intestinal and systemic rotavirus infection. **Journal of Virology**, **78**: 10213-10220, 2004.

RUIZ-PALACIOS, G.M.; PÉREZ-SCHAEL, I.; VELÁZQUEZ, F.R. et al. Safety and efficacy of an attenuated vaccine against severe rotavirus gastroenteritis. **The New England Journal of Medicine**, **354**: 11-22, 2006.

SANTOS, N.; SOARES, C.C.; VOLOTÃO, E.M. et al. Surveillance of rotavirus strains in Rio de Janeiro, Brazil, from 1997 to 1999. **Journal of Clinical Microbiology**, **41**: 3399-3402, 2003.

SOARES, L.S.; LOBO, P.S.; MASCARENHAS, J.D. et al. Identification of lineage III of G12 rotavirus strains in diarrheic children in the Northern Region of Brazil between 2008 and 2010. **Archives of Virology**, **157**: 135-139, 2012.

TATE, J.E.; BURTON, A.H.; BOSCHI-PINTO, C. et al. Global, Regional, and National Estimates of Rotavirus Mortality in Children <5 Years of Age, 2000-2013. **Clinical Infectious Diseases**, **62**: 96-105, 2016.

TODD, S.; PAGE, N.A.; DUNCAN STEELE, A. et al. Rotavirus strain types circulating in Africa: Review of studies published during 1997-2006. **The Journal of Infectious Diseases**, **202**: S34-42, 2010.

TROJNAR, E.; SACHSENRODER, J.; TWARDZIOK, S. et al. Identification of an avian group A rotavirus containing a novel VP4 gene with a close relationship to those of mammalian rotaviruses. **The Journal of General Virology**, **23**: 136-142, 2013.

VARSHNEY, B.; JAGANNATH, M.R.; VETHANAYAGAM, R.R. et al. Prevalence of, and antigenic variation in, serotype G10 rotaviruses and detection of serotype G3 strains in diarrheic calves: implications for the origin of G10P11 or P11 type reassortant asymptomatic strains in newborn children in India. **Archives of Virology**, **147**: 143-165, 2002.

VESIKARI, T.; ITZLER, R.; MATSON, D.O. et al. Efficacy of a pentavalent rotavirus vaccine in reducing rotavirus-associated health care utilization across three regions (11 countries). **International journal of infectious diseases**, **11**: S29-35, 2007.

VESIKARI, T.; MATSON, D.O.; DENNEHY, P. et al. Safety and efficacy of a pentavalent human-bovine (WC3) reassortant rotavirus vaccine. **The New England Journal of Medicine**, **354**: 23-33, 2006.

ZAMAN, K.; DANG, D.A.; VICTOR, J.C. et al. Efficacy of pentavalent rotavirus vaccine against severe rotavirus gastroenteritis in infants in developing countries in Asia: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. **Lancet**, **376**: 615-623, 2010.