



Infecções e reinfecções por *Rotavirus A*: genotipagem e implicações vacinais

Rotavirus A infections and reinfections: genotyping and vaccine implications

Paulo S. S. Costa¹, Divina D. P. Cardoso², Sandra J. F. E. Grisi³, Paula A. Silva⁴,
Fabiola Fiaccadori⁴, Menira B. L. D. Souza⁴, Rodrigo A. T. Santos⁴

Resumo

Objetivos: Identificar *Rotavirus A* em crianças com diarreia aguda, determinando os genótipos G e P prevalentes e avaliar a ocorrência de infecções e reinfecções por rotavírus do grupo A em crianças.

Métodos: Foram estudadas, prospectivamente, crianças com doença diarreica aguda e identificação de *Rotavirus A* em Goiânia (GO), durante o período de julho de 2000 a outubro de 2002. Igual número de crianças, pareadas por idade e sexo, que não apresentavam diarreia aguda e sem identificação de rotavírus nas amostras fecais à admissão ao estudo, representou o grupo controle. Foram analisadas a ocorrência de infecções ou reinfecções sintomáticas ou assintomáticas por rotavírus durante o período de estudo, durante um ano de seguimento em ambos os grupos. Todas as amostras positivas foram submetidas a genotipagem G e P através das reações de RT-PCR e Nested PCR.

Resultados: A infecção por rotavírus ocorreu em 37,2% (77 de 207 amostras fecais) das crianças com diarreia aguda durante o período do estudo. Os genótipos G e P identificados foram, simultaneamente: G1 (62,3%), G9 (34,4%) e G4 (3,3%) e P[8] (59%), P[6] (7,7%), P[6]+P[8] (23,1%), P[4]+P[8] (7,7%) e P[4]+P[6] (2,6%). As associações de genótipos G e P identificados durante o estudo foram: G1P[8] (77,8%), G9P[8] (11,1%), G4P[8] (5,6%) e G1P[6] (5,6%). Não houve reinfecção por rotavírus nos pacientes do grupo *Rotavirus A* (+) durante o período de seguimento, enquanto duas crianças do grupo controle apresentaram infecções sintomáticas por rotavírus durante o mesmo período.

Conclusões: Os genótipos G e P predominantes correspondem aos das candidatas atuais à vacina contra rotavírus. Não houve reinfecção por rotavírus pelo período de um ano em relação a todos os genótipos identificados.

J Pediatr (Rio J). 2004;80(2):119-22: Diarreia infantil, rotavírus, genótipo, seguimentos, estudos prospectivos.

Introdução

Os rotavírus constituem-se na causa mais freqüente de diarreia aguda grave na infância em países desenvolvidos e em desenvolvimento¹. Cerca de 125 milhões de episódios diarreicos por rotavírus ocorrem globalmente a cada ano,

Abstract

Objective: To identify rotavirus A and the most prevalent G and P genotypes in children with acute diarrhea, and to describe the occurrence of rotavirus infection and reinfection.

Methods: Group A rotavirus specimens were obtained from fecal samples from children with acute diarrhea in Goiânia, state of Goiás, Brazil from July 2000 to October 2002. Rotavirus A positive children and a control group (children of the same age and sex, without diarrhea and with no evidence of rotavirus in the first fecal samples) were followed prospectively during one year. All rotavirus A positive samples were genotyped using RT-PCR/nested-PCR.

Results: A total of 77 group A rotavirus strains (37.2%) were identified in the diarrheic samples of 207 children. The following G genotypes were identified: G1 (62.3%), G9 (34.4%) and G4 (3.3%). With regard to P genotyping, 59% were characterized as P[8], 7.7% as P[6], 23.1% as P[6]+P[8], 7.7% as P[4]+P[8] and 2.6% as P[4]+P[6]. The following associations were observed: G1P[8] (77.8%), G9P[8] (11.1%), G4P[8] (5.6%) and G1P[6] (5.6%). No reinfection was observed in the 40 rotavirus A (+) children. However, but two of 40 children who were initially negative for this agent developed rotavirus infection during the same period.

Conclusions: The predominant G and P genotypes observed were similar to those found in new vaccines. No reinfection occurred during one-year of follow-up for any of the genotypes identified.

J Pediatr (Rio J). 2004;80(2):119-22: Diarrhea, infantile, rotavirus, genotype, prospective studies.

culminando com 500.000 a 600.000 óbitos^{2,3}. Levantamentos epidemiológicos em escala mundial⁴ observaram a incidência de 12 a 71% (média 34%) de identificação de rotavírus em crianças menores de 3 anos de idade com diarreia aguda. Dados revisados no Brasil demonstram variações na incidência de gastroenterites associadas a rotavírus em crianças atendidas em ambulatórios ou hospitais, da ordem de 12 a 42%⁵⁻⁷.

Os *Rotavirus A* são classificados em genótipos G e P de acordo com variações antigênicas das proteínas estruturais VP7 e VP4, respectivamente. Há um predomínio, em escala global, das amostras caracterizadas como G1P[8]^{8,9}.

1. Doutor. Professor adjunto, Departamento de Pediatria e Puericultura, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Goiás (UFG).

2. Professora titular, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, UFG.

3. Professora Livre-Docente, Instituto da Criança, FMUSP.

4. Pós-graduandos, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, UFG.

Fontes financiadoras: Fundação de Apoio à Pesquisa (UFG) e CAPES.

Artigo submetido em 09.09.03, aceito em 09.01.04.

O impacto mundial da infecção pelo rotavírus tem conduzido ao desenvolvimento de estratégias vacinais capazes de reduzir a sua morbi-mortalidade. A vacina tetravalente (*rotashield*TM) teve seu uso suspenso devido ao potencial (embora controverso) desencadeamento de invaginação intestinal¹⁰⁻¹². Novas candidatas à vacina têm sido avaliadas em estudos recentes¹³⁻¹⁵.

O presente estudo avaliou a ocorrência de reinfecções por rotavírus e mapeou os genótipos prevalentes no intuito de subsidiar o desenvolvimento de procedimentos eficazes e seguros de prevenção, assim como de planejamento de ações de controle da doença diarréica por *Rotavirus A*.

Casuística e métodos

Foram estudadas 207 crianças com doença diarréica aguda, provenientes do atendimento nos prontos-socorros e enfermarias do Departamento de Pediatria e Puericultura da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Goiás e do Hospital Materno Infantil de Goiânia - Goiás, durante o período de julho de 2000 a outubro de 2002. Foi adotado como critério de inclusão a presença de doença diarréica aguda, considerada como a eliminação de três ou mais evacuações líquidas ou semilíquidas por dia. Os responsáveis pelos pacientes que preencheram o critério de inclusão foram esclarecidos sobre o estudo e, concordando com a participação da criança, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido, aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital das Clínicas da FMUSP.

Um total de 46 crianças com diarreia aguda e identificação de rotavírus nas fezes, e cujos responsáveis consentiram em permanecer em seguimento ambulatorial, foram selecionadas para um estudo prospectivo por um período de um ano. Igual número de crianças pareadas por idade e sexo, que não apresentavam diarreia aguda e sem identificação de rotavírus na amostras fecais à admissão ao estudo, representaram o grupo controle, seguindo os mesmos preceitos éticos.

Em ambos os grupos, avaliou-se a ocorrência de episódios diarréicos, associados ou não a reinfecções sintomáticas ou assintomáticas por rotavírus, durante o período de estudo, através da coleta das amostras fecais para a identificação dos rotavírus, no dia zero (admissão ao estudo), e a seguir mensalmente durante um ano de seguimento (além da coleta durante os episódios de diarreia aguda) das crianças dos grupos *Rotavirus A* positivo e controle. Os rotavírus foram identificados em amostras fecais através da eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA)¹⁶ e pelo ensaio imunoenzimático combinado para rotavírus e adenovírus (EIERA)¹⁷.

A determinação de genótipos de *Rotavirus A* foi feita pela reação em cadeia pela polimerase e pela reação de *Nested-PCR* para detecção dos segmentos genômicos codificantes das proteínas VP4 (genótipos P) e VP7 (genótipos G). A realização da primeira reação de amplificação (*RT-PCR*) utilizou os *primers* consensuais 9con1/9con2 (genotipagem G) e 4con2/4con3 (genotipagem P). Na reação seqüencial de *Nested-PCR*, foi utilizada a mistura de iniciadores espe-

cíficos para a identificação dos genótipos G1, G2, G3, G4, G5, G8, G9 e G10, bem como para a identificação dos genótipos P[4], P[6], P[8], P[9] e P[10]. Após a amplificação, os produtos obtidos de cada amostra fecal através do *RT-PCR* e da *Nested-PCR* foram aplicados em gel de agarose, visualizados em transluminador com luz ultravioleta e analisados em comparação com o padrão de peso molecular utilizado.

A análise estatística dos resultados foi realizada por meio do teste exato de Fisher, sendo fixado em 5% (alfa igual a 0,05) o nível de rejeição da hipótese de nulidade, com intervalo de confiança de 95%.

Resultados

Foram estudadas 207 crianças com doença diarréica aguda. Destas, 77 (37,2%) apresentaram positividade para *Rotavirus A* na primeira amostra fecal coletada, e 46 delas fizeram acompanhamento ambulatorial. Da mesma forma, 46 outras crianças que não apresentavam diarreia aguda à admissão nem detecção de rotavírus na primeira amostra fecal foram pareadas por idade e sexo e constituíram o grupo controle. Um total de 766 amostras fecais foram coletadas durante o seguimento em ambos os grupos; seis crianças de cada grupo foram excluídas do estudo por motivo de abandono.

A identificação dos genótipos G foi possível em 61 (79,2%) das 77 amostras de *Rotavirus A*. O genótipo G1 foi o mais prevalente, ocorrendo em 38 (62,3%) amostras genotipadas, seguido pelo genótipo G9, ocorrendo em 21 (34,4%) amostras, e G4, em duas amostras (3,4%).

Quanto aos genótipos P, sua identificação foi possível em 39 (50,6%) das 77 amostras de *Rotavirus A*. O genótipo P[8] foi o mais prevalente, sendo identificado em 23 (59%) das amostras genotipadas. O genótipo P[6] foi observado em três (7,7%) amostras. Um total de 16 amostras evidenciaram positividade simultânea para mais de um genótipo P, sendo identificadas as amostras com a dualidade P[6]+P[8] (23,1%), P[4]+P[8] (7,7%) e P[4]+P[6] (2,6%).

Em um total de 18 amostras (23,4%), foi possível correlacionar os genótipos G e P, sendo observado o predomínio ($p < 0,05$) das amostras caracterizadas como G1P[8] (77,8%), em comparação com G9P[8] (11,1%), G4P[8] (5,6%) e G1P[6] (5,6%) (Figura 1).

As 40 crianças do grupo seguimento *Rotavirus A* (+) apresentavam idade média de 19,2 meses, sendo 19 pacientes do sexo masculino e 21 do sexo feminino. Foram colhidas 380 amostras desse grupo durante o período de seguimento. Um total de 51 episódios diarréicos foi observado (média de 1,3 episódio diarréico/criança/ano). Em nenhuma amostra coletada das crianças desse grupo, no período de seguimento, foi identificado rotavírus.

O grupo controle, constituído também por 40 crianças, apresentavam idade média de 19,7 meses, sendo 20 crianças do sexo masculino e 20 do sexo feminino. Foram coletadas 386 amostras fecais no grupo controle. Observou-se um total de 48 episódios diarréicos nesse grupo, com

média de 1,2 episódio diarréico/criança/ano. Em duas crianças deste grupo foram identificados rotavírus nas fezes, associados a quadro diarréico, resultando em uma incidência de 0,05 infecções por rotavírus/criança/ano.

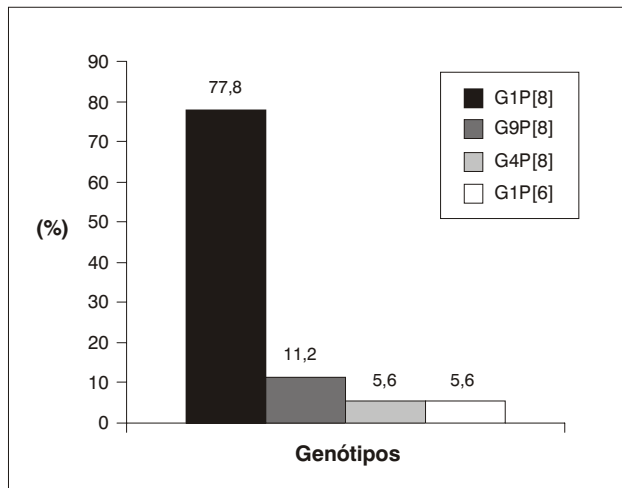


Figura 1 - Distribuição das 18 amostras de *Rotavirus A* identificadas com genotipagem G e P durante todo o período de coleta

Discussão

Foi observada uma positividade de 37,2% de *Rotavirus A* nas 207 amostras coletadas de crianças com diarreia aguda. De forma geral, dados semelhantes são observados na literatura⁴⁻⁶.

Nas amostras genotipadas, observou-se o predomínio de G1, embora percentuais elevados de G9 tenham sido detectados, e somente duas amostras foram caracterizadas como G4. Vários autores têm relatado o predomínio das amostras caracterizadas como G1-G4^{5,8,9,18,19}. Por outro lado, estudos demonstram a identificação crescente de sorotipos não usuais, com o genótipo G9 ocorrendo em 18,1% das infecções por rotavírus na Austrália²⁰. Tal fato ressalta que novos e emergentes sorotipos possam representar impacto nas estratégias vacinais, com ampliação na cobertura de genótipos além de G1-G4.

Em relação às associações G e P, houve predomínio das amostras caracterizadas como G1P[8]. O genótipo G1P[8], em âmbito global, destaca-se como o mais prevalente^{8,9,21,22}, o que pode subsidiar a implantação de candidatas a vacinas monovalentes humanas com especificidade para G1P[8] (*rotarix*TM - Glaxo Smithkline and Avant Immunotherapeutics, Inc, Needham, MA, USA), inclusive em nosso meio.

O estudo prospectivo das crianças *Rotavirus A* (+) e dos pacientes controle evidenciou a ausência de reinfecção por rotavírus, o que contrasta com vários estudos de seguimento, onde se obteve índices variáveis de reinfecção por rotavírus^{7,23-28}, os quais são mais elevados em estudos de acompanhamento desde o nascimento^{13,23,24}, bem como

em estudo em comunidades restritas, como indígenas e crianças de creche^{25,27,28}. Por outro lado, estudo amplo realizado na Finlândia²⁹ não identificou, de forma similar à nossa observação, reinfecção por rotavírus. Talvez esse fato possa estar relacionado a uma possível proteção conferida por infecções naturais por rotavírus ocorridas previamente e ao seguimento restrito ao período de um ano.

Outro aspecto relevante foi a detecção de duas infecções sintomáticas por rotavírus observadas durante o seguimento dos pacientes do grupo controle. A incidência de infecções por rotavírus observada por alguns autores apresenta variações entre 0,07 a 0,8 episódios por crianças por ano^{13,25,30,31}, em seguimento de crianças a partir do nascimento até 2 a 3 anos de idade. Tais índices são superiores aos observados no presente estudo, da ordem de 0,05 episódios de infecções por rotavírus por criança por ano no grupo controle, o que pode ser justificado pela faixa etária mais elevada, uma vez que o grupo controle foi pareado de acordo com a idade de um grupo de crianças já infectadas por rotavírus. Baseado em estudo de prevalência sorológica^{24,32} e da estimativa de que virtualmente todas as crianças até os 5 anos de idade já foram infectadas por rotavírus em pelo menos uma ocasião³³, é possível que uma porcentagem das crianças do grupo controle apresentasse algum grau de proteção frente a infecções prévias por rotavírus não detectadas neste estudo.

Este estudo pretende contribuir para o conhecimento da infecção pelos rotavírus do grupo A em crianças, através da vigilância dos genótipos G e P prevalentes na região. Dessa forma, pretende fornecer subsídios a pesquisas futuras de profilaxia em nosso meio, desde que outros estudos devam ser realizados, na vigilância contínua dos genótipos prevalentes em nosso meio, buscando a implementação definitiva de medidas preventivas eficazes no campo das infecções por rotavírus.

Agradecimentos

Ao apoio financeiro concedido exclusivamente através da Fundação de Apoio à Pesquisa (UFG) e CAPES.

Referências

1. Linhares AC, Bresee JS. Rotavirus vaccines and vaccination in Latin America. *Pan Am J Public Health*. 2000;8:305-31.
2. Kapikian AZ, Yasutaka H, Chanock RM. Rotaviruses. In: Knipe DM, Rowley PM, Griffin DE, Martin MA, Lamb RA, Roizaman B, editors. *Fields virology*. 4th ed. Philadelphia: Williams & Wilkins; 2001. p.1787-833.
3. Miller MA, McCann L. Policy analysis of the use of hepatitis B, Haemophilus influenzae type b-, Streptococcus pneumoniae-conjugate and rotavirus vaccines in national immunization schedules. *Health Econom*. 2001;9:19-35.
4. de Zoysa I, Feachem RG. Interventions for the control of diarrheal diseases among young children: rotavirus and cholera immunization. *Bull WHO*. 1985;63:569-83.
5. Pereira HG, Linhares AC, Candeias JAN, Glass RI. National laboratory surveillance of viral agents of gastroenteritis in Brazil. *Bull Pan Am Health Org*. 1993;27:224-33.
6. Linhares AC. Epidemiologia das infecções por rotavírus no Brasil e os desafios para o seu controle. *Cad Saude Publica*. 2000;16:629-46.

7. Linhares AC, Gabbay YB, Freitas RB, Travassos da Rosa ES, Mascarenhas JDP, Loureiro ECB. Longitudinal study of rotavirus infections among children from Belém, Brazil. *Epidemiol Infect.* 1989;102:129-45.
8. Gentsch JR, Woods PA, Ramacundran M, Das BK, Leite JP, Alfieri A, et al. Review of G and P typing results from a global collection of rotavirus strains: implications for vaccine development. *J Infect Dis.* 1996;174:30-6.
9. Iturriza-Gómara 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.* 2001;75:3696-705.
10. American Academy of Pediatrics, Committee on Infectious Diseases. Possible association of intussusception with rotavirus vaccination. *Pediatrics.* 1999;104:575.
11. Bass DM. Rotavirus vaccinology: good news and bad news. *J Pediatr Nutr.* 2000;30:10-1.
12. Dennehy PH, Breese JS. Rotavirus vaccine and intussusception. Where do we go from here? *Inf Dis Clin N Am.* 2001;15:512-32.
13. Clements-Mann ML, Dudas R, Hoshino Y, Nehring P, Sperber E, Wagner M, et al. Safety and immunogenicity of live attenuated quadrivalent human-bovine (UK) reassortant rotavirus vaccine administered with childhood vaccines to infants. *Vaccine.* 2001;19:4676-84.
14. Bernstein DI, Sack DA, Reisinger K, Rothstein E, Ward RL. Second-year follow-up evaluation of live, attenuated human rotavirus vaccine 89-12 in healthy infants. *J Inf Dis.* 2002;186:1487-9.
15. Johansen K, Schroderc U, Svensson L. Immunogenicity and protective efficacy of a formalin-inactivated rotavirus vaccine combined with lipid adjuvants. *Vaccine.* In Press 2003.
16. Pereira HG, Azeredo RS, Leite JPG, Barth OM, Suttmoller F, Farias V, et al. Comparison of polyacrilamide gel electrophoresis (PAGE), immunoelectron microscopy (IEM) and enzyme immunoassay (EIA) for the rapid diagnosis of rotavirus infection in children. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1983;78:483-90.
17. Pereira HG, Azeredo RS, Leite JPG, Andrade ZP, Castro LA. Combined enzyme immunoassay for rotavirus and adenovirus (EIARA). *J Virol Methods.* 1985;10:21-8.
18. Cardoso DDP, Soares CMA, Souza MBLD, Azevedo MSP, Martins RMB, Queiróz DAO, et al. Epidemiological features of rotavirus infection in Goiânia, Goiás, Brazil, from 1986 to 2000. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* In Press 2003.
19. Beards GM, Desselberger U, Flewett TH. Temporal and geographical distributions of human rotavirus serotypes, 1983 to 1988. *J Clin Microbiol.* 1989;27(12):2827-33.
20. Kirkwood C, Bogdanovic-Sakran N, Clark R, Masendycz P, Bishop R, Barnes G. Report of the Australian rotavirus surveillance program, 2000/2001. *Commun Dis Intell.* 2002;26(4):537-40.
21. Ramachandran M, Das BK, Vij A, Kumar R, Kesari N, Rawat H, et al. Unusual diversity of human rotavirus G and P genotypes in India. *J Clin Microbiol.* 1996;34:436-9.
22. Mascarenhas JDP, Linhares AC, Gabbay YB, Leite JPG. Detection and characterization of rotavirus G and P types from children participating in a rotavirus vaccine trial in Belém, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002;97:113-7.
23. Wyatt RG, Yolken RH, Urrutia JJ, Mata L, Greenberg HB, Chanock RM, et al. Diarrhea associated with rotavirus in rural Guatemala: a longitudinal study of 24 infants and young children. *Am J Trop Med Hyg.* 1979;28(2):325-8.
24. Bishop RF, Barnes GL, Cipriani E, Lund JS. Clinical Immunity after neonatal rotavirus infection. *N Engl J Med.* 1983;309:72-6.
25. Mata L, Simhon A, Urrutia JJ, Kronmal RA, Fernández R, García B. Epidemiology of rotavirus in cohort of 45 Guatemalan Mayan Indian children observed from birth to the age of three years. *J Infect Dis.* 1983;148:452-61.
26. Flores J, Pérez-Schael I, González M, Garcia D, Perez M, Daoud N, Cunto W, et al. Protection against severe rotavirus diarrhoea by rhesus rotavirus vaccine in Venezuelan infants. *Lancet.* 1987;1:882-4.
27. O'ryan MO, Matson DO, Estes MK, Bartlett AV, Pickering LK. Molecular epidemiology of rotavirus in children attending day care centers in Houston. *J Infect Dis.* 1990;162:810-6.
28. Moulton LH, Staat MA, Santosham M, Ward RL. The protective effectiveness of natural rotavirus infection in an American Indian population. *J Infect Dis.* 1998;178:1562-6.
29. Ruuska T, Vesikari T. A prospective study of acute diarrhoea in Finnish children from birth to 2½ years of age. *Acta Paediatr Scand.* 1991;80:500-7.
30. Zaki AM, Dupont HL, El Alamy MA, Arafat RR, Amin K, Awad MM, et al. The detection of enteropathogens in acute diarrhea in a family cohort population in rural Egypt. *Am J Trop Med Hyg.* 1986;35:1013-22.
31. Velázquez FR, Matson DO, Calva JJ, Guerrero L, Morrow AL, Carter-Campbell S, et al. Rotavirus infection in infants as protection against subsequent infections. *N Engl J Med.* 1996;335:1022-8.
32. Velázquez FR, Matson DO, Guerrero ML, Shults J, Calva JJ, Morrow AL, et al. Serum antibody as a marker of protection against natural rotavirus infection and disease. *J Inf Dis.* 2000;182:1602-9.
33. Cunliffe NA, Hart CA. Rotavirus vaccines: development, current issues and future prospects. *J Infect.* 2002;45:1-9.

Correspondência:

Paulo S. S. Costa

Rua J-34, 240 quadra 60 lote 12 Setor Jaó

CEP 74673-520 - Goiânia, GO

Tel.: (62) 204.4075 – Fax: (62) 212.8698

E-mail: plcosta@terra.com.br