

Characterization of rotavirus strains from day care centers: pre- and post-rotavirus vaccine era

Caracterização de genótipos de rotavírus em creches: era pré- e pós-vacinação contra o rotavírus

Simone G. Morillo,¹ Adriana Luchs,¹ Audrey Cilli,² Fernanda F. Costa,²
Rita de Cassia C. Carmona,¹ Maria do Carmo S. T. Timenetsky³

Resumo

Objetivos: Em 2006, a vacina contra rotavírus foi incluída no Programa Nacional de Imunização. Este estudo teve como objetivo analisar os resultados da vigilância de genótipos de rotavírus em crianças < 5 anos com gastroenterites agudas provenientes de creches no estado de São Paulo por um período de 5 anos.

Métodos: Este estudo retrospectivo foi realizado em 30 creches no período de 2004 a 2008, com amostras fecais convenientes da vigilância das diarreias agudas, analisadas por ELISA, SDS-PAGE, RT-PCR e sequenciamento genético para caracterização do genótipo.

Resultados: Infecções por rotavírus foram detectadas em 28,3% de amostras (38/34). Os genótipos mais frequentes detectados foram: G9P[8] e G1P[8] em 2004; G1P[8] em 2005; GNTP[NT] em 2006; G2P[4] em 2007; e nenhum caso foi relatado em 2008. Infecções mistas não foram observadas. A taxa de detecção diminuiu de 65,7% (23/35) em 2004 para 50% (9/18) em 2007.

Conclusões: A distribuição do genótipo variou de acordo com os anos, acompanhada pela redução no número de casos detectados. É necessário intensificar a vigilância pós-implantação da vacina contra rotavírus, visando monitorar as linhagens circulantes e sua eficácia contra possíveis genótipos emergentes.

J Pediatr (Rio J). 2010;86(2):155-158: Rotavírus, creches, gastroenterites.

Introdução

Patógenos virais são as causas mais comuns de gastroenterite em comunidades e em outros contextos, inclusive em instituições semifechadas e hospitais¹. Na infância, os rotavírus do grupo A (RVA) são considerados o agente etiológico mais

Abstract

Objectives: In 2006 the rotavirus vaccine was included in the Brazilian Immunization Program. The aim of this study was to report the results of a 5-year surveillance study of rotavirus strains in children < 5 years with acute gastroenteritis from day care centers in the state of São Paulo, Brazil.

Methods: This retrospective study was conducted with 30 day care centers from 2004 to 2008 with convenient surveillance fecal specimens, investigated by ELISA, SDS-PAGE, RT-PCR and gene sequencing to genotype characterization.

Results: Rotavirus infection was detected in 28.3% of samples (38/134). The most frequent genotypes detected were G9P[8] and G1P[8] in 2004; G1P[8] in 2005; GNTP[NT] in 2006; G2P[4] in 2007; and there were no cases in 2008. Mixed infections were not observed. Detection rate declined from 65.7% (23/35) in 2004 to 50% (9/18) in 2007.

Conclusions: Genotype distribution varied according to collection year, accompanied by a reduction in detection rate. Use of rotavirus vaccine requires implementation of post-marketing surveillance to monitor rotavirus strain diversity and its efficacy against possible new emerging genotypes.

J Pediatr (Rio J). 2010;86(2):155-158: Rotavirus, day care centers, gastroenteritis.

importante de gastroenterite não-bacteriana aguda, inclusive surtos e casos esporádicos, independentemente das melhorias em saneamento básico e procedimentos higiênicos². Os RVA são o principal agente etiológico em diarreia aguda

1. Mestre. Instituto Adolfo Lutz, Laboratório de Vírus Entéricos, São Paulo, SP.

2. Instituto Adolfo Lutz, Laboratório de Vírus Entéricos, São Paulo, SP.

3. Doutor. Instituto Adolfo Lutz, Laboratório de Vírus Entéricos, São Paulo, SP.

Conflitos de interesse: Timenetsky MC foi o principal investigador durante a vacina RIX4414 em São Paulo (SP). Instituto Adolfo Lutz, Secretaria de Vigilância em Saúde e Ministério da Saúde, em um acordo preestabelecido com GSK, receberam fundos de pesquisa apenas para despesas com funcionários, equipamentos e entradas.

Suporte financeiro: Instituto Adolfo Lutz, Secretaria da Saúde, São Paulo, SP.

Citação sugerida: Morillo SG, Luchs A, Cilli A, Costa FF, Carmona RC, Timenetsky MC. Characterization of rotavirus strains from day care centers: pre- and post-rotavirus vaccine era. *J Pediatr (Rio J)*. 2010;86(2):155-158.

Artigo submetido em 21.09.09, aceito em 23.12.09.

doi:10.2223/JPED.1981

em crianças, responsável por mais de 600.000 óbitos por ano³, além do significativo impacto econômico da doença causada por RVA⁴.

Em 2006, uma vacina atenuada G1P[8] foi incluída no Programa Nacional de Imunização, prevenindo gastroenterite grave do rotavírus e induzindo uma redução significativa na frequência de detecção de RVA em crianças com gastroenterite⁵. Na verdade, a eficácia da vacina RIX4414 foi avaliada por Araujo et al.⁶, demonstrando 53,9 a 81,5% de proteção contra casos graves, e 81,2 a 93,0% de proteção contra hospitalização em função de gastroenterite do rotavírus em crianças.

Recentemente, relatou-se uma alta prevalência de G2P[4] e associada com essa vacinação no Brasil⁷, sugerindo que essa vacina monovalente possivelmente criou condições em que o G2P[4] poderia adquirir vantagem seletiva sobre genótipos P[8]. Investigações mais detalhadas em relação à proteção heterológica conferida pela vacina monovalente contra o rotavírus são pontos centrais para entender seu comportamento imunológico^{6,8}.

O objetivo deste estudo foi relatar os resultados de um estudo de vigilância de 5 anos de genótipos do rotavírus em crianças < 5 anos com gastroenterite aguda de creches no Estado de São Paulo, e avaliar as tendências de detecção.

Métodos

Este estudo retrospectivo foi conduzido em 30 creches de 2004 a 2008, com espécimes convenientes da vigilância coletados de crianças com menos de 5 anos que apresentavam gastroenterite aguda. Amostras de fezes de pacientes com gastroenterite aguda foram enviadas ao Laboratório de Vírus Entéricos do Instituto Adolfo Lutz (IAL), um centro de referência macrorregional para vigilância do rotavírus e membro do Programa de Monitoramento de Doenças Diarreicas Agudas (PMDDA). Esse programa tem por objetivo a detecção precoce de surtos de diarreia em todo o país e foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética.

As amostras estudadas eram parte do PMDDA, obtidas de uma amostragem retrospectiva de conveniência, sem critérios de inclusão ou exclusão, sem caracterização das creches participantes; portanto, o estudo pode não ser representativo do cenário epidemiológico real. Foi realizada uma caracterização molecular de genótipos do rotavírus antes e depois de vacinação com Rotarix[®]. Avaliação clínica não foi incluída, então o estudo não permite avaliação de segurança, imunogenicidade ou proteção oferecida pela vacinação.

Um total de 134 amostras fecais foi testado quanto a RVA usando um ensaio imunoenzimático comercial (Premier[™] Rotacclone[®], Meridian Bioscience Inc., EUA), realizado de acordo com as instruções do fabricante, e eletroforese em gel de poli(acrilamida) (PAGE). Amostras de fezes positivas para rotavírus foram tipificadas após transcrição reversa seguida de *nested-PCR* e sequenciamento com BigDye[™] em um ABI 377 (Applied Biosystems Inc., EUA), analisadas com o *software* DNASTAR.

Resultados

Infecção por rotavírus foi detectada em 28,3% (38/134), e todas as amostras pertenciam ao grupo A, com base no padrão de migração no PAGE. A distribuição genotípica mostrou um perfil diferente para cada ano: 28,5% G9P[8] (10/35), 14,2% G1P[8] (5/35) e 20% GNTP[NT] (7/35) em 2004; 5,4% G1P[8] (2/37) em 2005; 9% GNTP[NT] (4/44) em 2006; 11,1% G2P[4] (2/8) em 38,8% GNTP[NT] (7/18) em 2007. Não foram observadas infecções mistas.

A taxa de detecção foi reduzida de 65,7% (23/35) em 2004 para 50% (9/18) em 2007, sem casos em 2008 (Tabela 1).

A relação entre as sequências VP7 das sete cepas G9 ((R792, R840, R848, R863, R865, R866, R869), uma cepa G1 (R788), e uma cepa representativa do genótipo G9 (Mc345) e do genótipo G1 (Wa) foi demonstrada como uma árvore de distância construída usando o método Clustal. A comparação das sequências G9 mostrou similaridade de 94,9% quando

Tabela 1 - Resultados gerais de genotipagem em crianças de creches com diarreia aguda no Estado de São Paulo, Brasil, de 2004 a 2008: era pré- e pós-vacinação contra o rotavírus

Ano	Total de amostras	Número de positivos	Rotavírus por genótipo (%)			
			G9P[8]	G1P[8]	G2P[4]	NT
2004	35	22	28,5	14,2	0	20
2005	37	2	0	5,4	0	0
2006	44	4	0	0	0	9
2007	18	9	0	0	11	38,8
2008	0	0	0	0	0	0

NT = resultados não tipificáveis.

comparadas com Mc345 e similaridade de 95,6 a 99,8% entre elas. A comparação da sequência G1 mostrou similaridade de 90,3% quando comparada à Wa.

Discussão

Nossos dados mostram a presença de RVA G9P[8], G2P[4] e G1P[8], em conformidade com a prevalência mundial relatada para esses três genótipos⁹. Conforme esperado, o G9 foi o genótipo mais frequente em circulação desde 2004. Esse genótipo foi previamente detectado no Brasil, de acordo com a emergência global^{10,11}. O G1 foi o segundo mais comum tipo G encontrado, correspondendo aos resultados de diversos estudos com foco na distribuição do RVA tipo G em muitos países, inclusive no Brasil^{9,11}.

O genótipo G2P[4] foi a única cepa observada em 2007. Alternativamente à proposição de que a vacina RIX4414 criava condições em que o G2P[4] poderia ter adquirido vantagem seletiva, uma periodicidade temporal, dentro de padrão cíclico de ~ 10 anos do G2P[4] foi observada no Brasil¹¹ e deve ser considerada uma explicação alternativa ao aumento na taxa de detecção desse genótipo desde 2006. Embora tal periodicidade possa estar relacionada à introdução da vacina contra RVA¹¹, o genótipo G2P[4] também foi o tipo mais prevalente de RVA detectado em 2007 no noroeste de Portugal, uma população que não havia recebido vacina contra RVA¹². Portanto, ao menos em alguns contextos, essa prevalência não pode ser explicada pela introdução da vacinação e pode refletir flutuação normal de genótipos do RVA co-circulantes, o que está de acordo com relatos de outros países e áreas, em população não vacinada, mostrando exatamente os mesmos resultados¹³, inclusive na América do Sul¹⁴.

Cepas não-tipificáveis de RVA foram relatadas em quase todos os estudos epidemiológicos em todo o mundo, independentemente da metodologia usada. Em nosso estudo, durante 2006 nenhuma amostra positiva de creches pôde ser genotipada por RT-PCR multiplex, ao passo que quase todas as amostras positivas de RVA do PMDDA de outros contextos mostraram especificidade de G2P[4]. Para vigilância epidemiológica de genótipos do rotavírus e para o desenvolvimento de vacinas efetivas contra o rotavírus, há uma necessidade de técnicas diagnósticas sensíveis e confiáveis, como o método de *microarray* em hibridização com oligonucleotídeos¹⁵. A combinação da sensibilidade do PCR com a especificidade da hibridização ajuda a detectar com êxito e identificar sem ambiguidade esses genótipos G.

Quanto aos períodos pré e pós-vacinação, as mudanças na distribuição de genótipos observadas são acompanhadas de uma redução na taxa de detecção do RVA em amostras de creches enviadas ao IAL, começando com 65,7% (23/35) em 2004 e passando para 50% (9/18) em 2007, sem nenhum caso em 2008. Na verdade, essa redução foi observada no número de surtos gerais de RVA no Estado de São Paulo de 35 (10.481 casos) em 2004; 24 (3.144 casos) em 2005; 35 (2.084 casos) em 2006; oito (164 casos) em 2007; a um (três casos) em 2008¹⁶. Por outro lado, análises de surtos de RVA

em vigilâncias de anos anteriores¹⁷ sugerem um padrão mais variável, com uma flutuação natural de casos de RVA.

Quanto a outras vacinas, recomenda-se a implementação de vigilância pós-comercialização, principalmente porque diversos genótipos do RVA co-circulam na população humana. É importante monitorar a diversidade do RVA e sua eficácia, uma vez que novos genótipos emergentes podem não compartilhar o antígeno do capsídeo com o vírus da vacina. Mais estudos relativos à ecologia das infecções por rotavírus serão importantes para entender melhor se a redução na taxa de detecção do RVA observada nos últimos anos é consequência direta da implementação da vacina ou apenas um padrão cíclico.

Referências

- Vernacchio L, Vezina RM, Mitchell AA, Lesko SM, Plaut AG, Acheson DW. Diarrhea in American and young children in the community setting: incidence, clinical presentation and microbiology. *Pediatr Infect Dis J*. 2006;25:2-7.
- Xavier MP, Oliveira SA, Ferreira MS, Victoria M, Miranda V, Silva MF, et al. Detection of calicivirus associated with acute infantile gastroenteritis in Salvador, an urban center in Northeast Brazil. *Braz J Med Biol Res*. 2009;42:438-44.
- Parashar UD, Gibson CJ, Bresse JS, Glass RI. Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerg Infect Dis*. 2006;12:304-6.
- Afonso A, Antunes H. Infecção por rotavírus: implicações e custos. *Acta Pediatr Port*. 2007;38:138-43.
- Gurgel RQ, Correia JB, Cuevas LE. Effect of rotavirus vaccination on circulating virus strains. *Lancet*. 2008;371:301-2.
- Araujo EC, Clemens SA, Oliveira CS, Justino MC, Rubio P, Gabbay YB, et al. Safety, immunogenicity, and protective efficacy of two doses of RIX4414 live attenuated human rotavirus vaccine in healthy Brazilian infants. *J Pediatr (Rio J)*. 2007;83:217-24.
- Nakagomi T, Cuevas LE, Gurgel RG, Elrokhsi SH, Belkhir YA, Abugalia M, et al. Apparent extinction of non-G2 rotavirus strains from circulation in Recife, Brazil, after introduction of rotavirus vaccine. *Arch Virol*. 2008;153:591-3.
- Bernstein DI. RIX4414 (Rotarix): a live attenuated human rotavirus vaccine. *J Pediatr (Rio J)*. 2007; 83:193-5.
- Bányai K, Gentsch JR, Schipp R, Jakab F, Meleg E, Mihály I, et al. Dominating prevalence of P[8],G1 and P[8],G9 rotavirus strains among children admitted to hospital between 2000 and 2003 in Budapest, Hungary. *J Med Virol*. 2005;76:414-23.
- Carmona RC, Timenetsky Mdo C, Morillo SG, Richtzenhain LJ. Human rotavirus serotype G9, São Paulo, Brazil, 1996-2003. *Emerg Infect Dis*. 2006;12:963-8.
- Carvalho-Costa FA, Assis RM, Fialho AM, Bóia MN, Alves DP, Martins CM, et al. Detection and molecular characterization of group A rotavirus from hospitalized children in Rio de Janeiro, Brazil, 2004. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006;101:291-4.
- Antunes H, Afonso A, Iturriza M, Martinho I, Ribeiro C, Rocha S, et al. G2P[4] the most prevalent rotavirus genotype in 2007 winter season in an European non-vaccinated population. *J Clin Virol*. 2009;45:76-8.
- Desselberger U, Wolleswinkel-van den Bosch J, Mrukowicz J, Rodrigo C, Giaquino C, Vesikari T. Rotavirus types in Europe and their significance for vaccination. *Pediatr Infect Dis J*. 2006;25: S30-41.
- Ferrera A, Quan D, Espinoza F. Increased prevalence of genotype G2P(4) among children with rotavirus-associated gastroenteritis in Honduras. 17th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases ICC; 2007 Mar 31-Apr 04; Munich. Hoboken (NJ): Wiley-Blackwell; 2007.

15. Honma S, Chizhikov V, Santos N, Tatsumi M, Timenetsky MC, Linhares AC, et al. Development and validation of DNA microarray for genotyping group A rotavirus VP4 (P[4], P[6], P[8], P[9], and P[14]) and VP7 (G1 to G6, G8 to G10, and G12) genes. *J Clin Microbiol.* 2007;45:2641-8.
16. CVE [website]. São Paulo: Centro de Vigilância Epidemiológica. http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/rotavirus_dados.html. Acesso: 17/09/2009.
17. CVE [website]. São Paulo: Centro de Vigilância Epidemiológica. http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/hidri_estat.html. Acesso: 20/09/2009.

Correspondência:
Simone Guadagnucci Morillo
Instituto Adolfo Lutz, Departamento de Virologia,
Laboratório de Vírus Entéricos
Avenida Dr Arnaldo, 355
CEP 01246-902 - São Paulo, SP
Tel.: (11) 3068.2909
Fax: (11) 3085.3505
E-mail: sgmorillo@gmail.com