



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Pesquisa Clínica Evandro Chagas
Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas

DOUTORADO

MARIA CLEONICE AGUIAR JUSTINO

**EFETIVIDADE DA VACINA ORAL CONTRA
ROTAVÍRUS HUMANO ESPÉCIE A, E
MONITORAMENTO DAS AMOSTRAS VIRAIS
CIRCULANTES EM BELÉM, PARÁ, BRASIL**

Rio de Janeiro

2013

**EFETIVIDADE DA VACINA ORAL CONTRA
ROTAVÍRUS HUMANO ESPÉCIE A E
MONITORAMENTO DAS AMOSTRAS VIRAIS
CIRCULANTES EM BELÉM, PARÁ, BRASIL**

MARIA CLEONICE AGUIAR JUSTINO

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas, do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, para obtenção do grau de Doutor em Ciências em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas, sob a orientação da Dra. Patrícia Brasil e do Dr. Alexandre da Costa Linhares.

Rio de Janeiro

2013

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

J96 Justino, Maria Cleonice Aguiar

Efetividade da vacina oral contra rotavírus humano espécie A e monitoramento das amostras virais circulantes em Belém, Pará, Brasil / Maria Cleonice Aguiar Justino. – Rio de Janeiro, 2013.

ix, 106 f.: il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) - Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas, 2013.

Bibliografia: f. 87-103

1. Gastroenterite. 2. Rotavírus. 3. Vacina contra rotavirus. 4. Efetividade. 5. Genótipo. I. Título.

CDD 614.58

MARIA CLEONICE AGUIAR JUSTINO

**EFETIVIDADE DA VACINA ORAL CONTRA
ROTAVÍRUS HUMANO ESPÉCIE A E MONITORAMENTO
DAS AMOSTRAS VIRAIS CIRCULANTES EM BELÉM,
PARÁ, BRASIL**

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas, do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, para obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Orientadores: Dra. Patrícia Brasil e Dr. Alexandre da Costa Linhares

Aprovada em / /

BANCA EXAMINADORA

Dr. Carlos Andrade (Presidente)
Doutor em Ciências
IPEC/Fiocruz

José Paulo Gagliardi Leite
Doutor em Ciências.
IOC/Fiocruz

Dr. Filipe Anibal Carvalho-Costa
Doutor em Medicina Tropical
IOC/Fiocruz

Dra Maria Elisabeth Lopes Moreira
Doutora Saúde da Criança e Adolescente
IFF/Fiocruz

Dr. Eduardo de Mello Volotão
Doutor em Ciências
IOC/Fiocruz

Dra Thalita Fernandes Abreu
Doutora em Pesquisa Clínica em Doenças
Infecciosas
IPEC/Fiocruz (Suplente)

A minha mãe Creuza, cujo incentivo foi decisivo para abraçar mais esse desafio em minha vida profissional.

Ao meu pai Manuel (in memoriam) cujos ensinamentos e força se mantêm presentes em minha vida em todos os meus grandes (melhores e piores) momentos.

Aos meus filhos Maria Clara e Vitor, tão pequenos e tão companheiros, a razão maior de meus anseios.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Patrícia Brasil pelo cuidado na orientação desse trabalho, pelo estímulo permanente e pelo ombro sempre amigo.

Ao Dr. Alexandre Linhares, investigador principal desse estudo, mais que orientador, um verdadeiro pai para mim, a quem serei eternamente grata pela oportunidade de aprendizado e convivência.

À Dra. Eliete Araújo, cujas palavras de incentivo me permitiram ousar o sonho de cursar o doutorado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas, na Fiocruz (Rio de Janeiro), possibilitando trazer o conhecimento adquirido e o título inédito para o Instituto Evandro Chagas, no Pará.

À Direção do Instituto Evandro Chagas/SVS/MS pela compreensão e apoio ao cumprimento desse doutorado.

À Coordenação da Pós-Graduação do IPEC, especialmente ao Dr. Armando Schubach, Dra. Cristina Possas e à secretária Priscila pelo apoio incondicional.

Às colegas de doutorado Erica e Magyda pelo apoio, carinho e amizade.

Aos funcionários da Casa Amarela (vila residencial da Fiocruz), minha “casa” no Rio de Janeiro, na qual me hospedei em todas as etapas do doutorado. Agradeço a hospitalidade e simpatia.

À equipe do estudo EPI-ROTA, do Instituto Evandro Chagas, em Belém, Pará, pelo rigor na realização de todos os procedimentos preconizados pelo protocolo, permitindo-me a tranquilidade necessária para executar a coordenação clínica dessa pesquisa. Agradeço especialmente às colegas pediatras Erica Abreu e Yllen Miranda, e à enfermeira Veronilce Borges.

Aos pais/responsáveis legais, por terem permitido a participação de suas crianças nesse estudo entendendo a importância de sua realização.

“É preferível a angústia da busca à paz da acomodação”

Autor desconhecido

RESUMO

Globalmente, os rotavírus da espécie A (RVA) são a principal causa de doença diarreica aguda grave em crianças abaixo de cinco anos de idade, sendo responsáveis por mais de um terço de todas as hospitalizações por diarreia e 453.000 óbitos a cada ano, principalmente nos países em desenvolvimento. Ensaio clínico multicêntrico envolvendo aproximadamente 100.000 crianças na América Latina, Europa, África e Ásia demonstraram a segurança e a eficácia da vacina monovalente contra RVA de origem humana (Rotarix[®], GlaxoSmithKline, Bélgica), em prevenir gastroenterite grave causada por esse agente viral em crianças. No Brasil essa vacina foi introduzida no Programa Nacional de Imunizações em 6 de março de 2006, sob a denominação de Vacina Oral contra Rotavírus Humano (VORH). Realizou-se estudo caso-controle de base hospitalar que avaliou a efetividade da vacina através da vigilância diária das hospitalizações por gastroenterite ocorridas entre crianças nascidas após seis de março de 2006, em quatro clínicas selecionadas em Belém, Pará. Consentimento por escrito foi obtido dos pais/responsável legal pela criança antes de sua inclusão no estudo. Após a hospitalização, amostras de fezes dessas crianças foram coletadas e enviadas à Seção de Virologia do Instituto Evandro Chagas para detecção dos RVA por ensaio imunoenzimático (ELISA). As amostras positivas foram posteriormente genotipadas por reação em cadeia da polimerase precedida de transcrição reversa (RT-PCR). No primeiro ano (2008-2009), 538 crianças foram incluídas no estudo como casos (gastroenterite grave por RVA) e pareadas, de acordo com a idade, a 507 controles hospitalares e 346 domiciliares; estes, sem quaisquer sintomas de gastroenterite. Haviam recebido esquema vacinal completo quanto a VORH (duas doses) 54%, 61% e 74% dos casos, controles hospitalares e domiciliares, respectivamente. Ressaltem-se as taxas de cobertura vacinal de 81,18% e 84,38% em 2008 e 2009, respectivamente. A efetividade da vacina foi de 75,8% (IC95%: 58,1-86,0) utilizando-se controles domiciliares e 40,0% (IC95%: 14,2-58,1) frente aos hospitalares. Entre crianças de 3-11 meses e maiores de 12 meses de idade as taxas de efetividade alcançaram 95,7% (IC95%: 67,8-99,4) e 65,1% (IC95%: 37,2-80,6), respectivamente, usando controles domiciliares. Menor efetividade foi observada ao utilizar controles hospitalares, sendo de 55,6% (IC95%: 12,3-77,5) nos grupos etários de 3-11 meses. Houve diferença estatisticamente significativa na duração dos sintomas de febre, diarreia, vômitos, alteração do estado geral e tempo de hospitalização entre os pacientes que receberam esquema completo com a VORH (duas doses) em relação àqueles que receberam somente uma dose e os que não foram imunizados. Foi realizado o monitoramento dos genótipos circulantes de RVA através de vigilância dos casos de gastroenterite por um período de três anos (2008 a 2011). No primeiro ano, o genótipo G2P[4] predominou representando 82,0% das hospitalizações, e a efetividade vacinal específica frente a este genótipo alcançou 75,4% (IC95%: 56,7-86,0) usando controles domiciliares e 38,9% (IC95%: 11,1-58,0) entre controles hospitalares. Nos anos seguintes observou-se predomínio do genótipo G1P[8] e dos padrões mistos no que se refere à especificidade G ou P. Os resultados obtidos nesse estudo demonstraram a boa efetividade da vacina VORH frente aos casos graves de gastroenterite causada por RVA em condições reais na população estudada, inclusive contra genótipo distinto daquele contido na composição da vacina. Além disso, permitiu o monitoramento da circulação de amostras virais no período de três anos consecutivos em Belém, Pará, demonstrando variação nos genótipos circulantes ao longo do estudo; o que corrobora a hipótese de flutuação natural das amostras circulantes ao longo do tempo.

Palavras-chave: 1. Gastroenterite. 2. Rotavírus. 3. Vacina contra rotavirus. 4. Efetividade. 5. Genótipo.

ABSTRACT

Worldwide species A rotavirus (RVA) remains the most important cause of acute, severe diarrheal disease among children aged less than five years, accounting for over one-third of diarrhea-related hospitalizations and 453,000 deaths annually. Multi-centric clinical trials involving around 100,000 children in Latin America, Europe, Africa, and Asia have demonstrated the safety and efficacy of the monovalent vaccine with an attenuated human species A G1P[8] RVA strain (Rotarix™, GlaxoSmithKline, Rixensart, Belgium). Efficacy was particularly significant against severe childhood gastroenteritis. This vaccine was introduced into the Brazilian National Immunization Program on March 6, 2006, thereafter being nationally named “Vacina oral contra Rotavirus Humano” (“VORH”). A hospital-based, case-control study was conducted in four pediatric clinics located in Belém, Pará, with the main objective of assessing the effectiveness of Rotarix™. This study involved children born after 6 March 2006, and included daily surveillance for gastroenteritis-related hospitalizations in the study area. Written informed consent was obtained from the parents or legal guardians of children before enrolment. Fecal samples were obtained following hospitalization and transported to the Virology Section of “Instituto Evandro Chagas” for detection of RVA by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Rotavirus-positive samples were subsequently genotyped using the reverse-transcription, polymerase chain reaction (RT-PCR). During the first year of the study (2008-2009), 538 children were included as cases, that is, laboratory-confirmed rotavirus-related gastroenteritis, and paired with age-matched hospital-controls (n=507) and neighborhood controls (n=346) without any gastroenteritis symptoms. A full RVA vaccination course (2 doses) was provided to 54%, 61% and 74% of cases, hospital controls and neighborhood controls, respectively. Official rotavirus vaccine coverage rates for the region were reported to be 81.18% and 84.38% in 2008 and 2009, respectively. Vaccine effectiveness rates of 75.8% (95%CI: 58.1-86.0) and 40% (95%CI 14.2-58.1) were achieved using neighborhood and hospital controls, respectively. Using neighborhood controls, vaccine effectiveness rates were 95.7% (95%CI: 67.8-99.4) and 65.1% (95%CI: 37.2-80.6) among children aged 3-11 months and >12 months, respectively. Lower vaccine effectiveness was achieved when using hospital controls: 55.6% (95%CI: 12.3-77.5). There was a statistically significant difference in duration of symptoms of fever, diarrhea, vomiting, days of behaviour change and hospitalization among patients who received full series vaccination compared to those who received only one dose and those who were not immunized. Monitoring of circulating rotavirus strains was conducted concurrently with the case-control study and extended up to 2011. During the first year of surveillance G2P[4] strains were predominant, accounting for 82.0% of circulating strains among hospitalized children. Vaccine effectiveness against gastroenteritis caused by this genotype yielded 75.4% (95%CI: 56.7-86.0) and 38.9% (95%CI: 11.1-58.0) as based on analyses using neighborhood and hospital controls, respectively. In the following two years there was a trend for increasing prevalence of G1P[8] strains, and a significant proportion of species A rotaviruses bearing mixed G- and P-genotype specificities. In conclusion, this study showed a good vaccine efficacy of “VORH”, “under real conditions”, against severe rotavirus gastroenteritis in children in Belém, Brazil, including a significant heterotypic protection against G2P[4] strains which are fully distinct from the vaccine composition. The long-term monitoring of circulating rotavirus strains showed a variation of genotypes during the study; this strongly suggests a natural fluctuation of strains over time.

Key-words: 1. Gastroenteritis. 2. Rotavirus. 3. Rotavirus vaccine. 4. Effectiveness. 5. Genotype.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO LITERATURA	3
2.1 HISTÓRICO	3
2.2 AGENTE ETIOLÓGICO	3
2.3 EPIDEMIOLOGIA	6
2.4 PATOGÊNESE	8
2.5 IMUNOLOGIA	10
2.6 QUADRO CLÍNICO	11
2.7 ANTIGENEMIA E VIREMIA NAS INFECÇÕES POR ROTAVÍRUS	14
2.8 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL	16
2.9 TRATAMENTO	17
2.10 PREVENÇÃO E CONTROLE	19
2.11 COBERTURA DA VACINA ORAL CONTRA ROTAVÍRUS HUMANO NO BRASIL	26
2.12 GENÓTIPOS CIRCULANTES DE ROTAVÍRUS ANTES E APÓS A INTRODUÇÃO DAS VACINAS	28
2.13 IMPACTO DAS VACINAS CONTRA ROTAVIRUS NA MORBIDADE	31
2.14 IMPACTO DAS VACINAS CONTRA ROTAVIRUS NA MORTALIDADE	33
3 JUSTIFICATIVA	35
4 OBJETIVOS	37
4.1 GERAL	37
4.2 ESPECÍFICOS	37
5. MÉTODOS	38
6 RESULTADOS	38
6.1 ARTIGO I	40
6.2 ARTIGO II	55
6.3 ARTIGO III	68
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	79
8 CONCLUSÕES	86
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
ANEXOS	

LISTA DE ABREVIATURA

- EIE – Ensaio Imunoenzimático
- GAVI – *Global Alliance for Vaccines and Immunization*
- GE – Gastroenterite
- IDH – Índice de Desenvolvimento Humano
- IEC - Instituto Evandro Chagas
- IgA – Imunoglobulina A
- IgG – Imunoglobulina G
- IS – Intussuscepção
- MS - Ministério da Saúde
- Nm - Nanômetro
- NSP4 – *No structural protein 4*
- OMS - Organização Mundial de Saúde
- RVA – Rotavírus espécie A
- RNA - *Ribonucleic acid*
- RT-PCR - Reação em cadeia da polimerase precedida da transcrição reversa
- SRO – Sais de reidratação oral
- VP – *Viral protein*
- WHO – *World Health Organization*

1. INTRODUÇÃO

Rotavirose são as causas mais comuns de gastroenterite grave com desidratação entre crianças com idades abaixo de cinco anos em todo o mundo, tanto nos países desenvolvidos quanto naqueles em desenvolvimento, onde ocorre a maioria dos óbitos (Parashar *et al.*, 2006)

O impacto global da doença causada por rotavírus da espécie A (RVA) é de pelo menos 25 milhões de atendimentos ambulatoriais e dois milhões de hospitalizações, resultando em aproximadamente 453.000 óbitos entre crianças menores de cinco anos de idade, anualmente (Munos *et al.*, 2010; Tate *et al.*, 2011). No Brasil, estima-se que num cenário sem a vacina ocorreriam anualmente 3.525.053 episódios de diarreia, 655.853 consultas, 92.453 hospitalizações e 850 mortes associadas às rotavírus (Sartori *et al.*, 2008).

A alta taxa de infecção por RVA, cujo pico de incidência ocorre entre 6 e 24 meses de idade, torna difícil o controle da expansão da doença, sendo a vacinação considerada a estratégia ideal para prevenir a gastroenterite aguda grave causada por esse enteropatógeno.

Desde a década de 1990, vários ensaios clínicos vêm sendo conduzidos em todo o mundo com o intuito de pesquisar vacinas seguras e eficazes contra RVA.

Em 1998, uma vacina tetravalente de origem símio-humana, geneticamente rearranjada, foi desenvolvida pela Wyeth Lederle Vaccines (Philadelphia) sob a designação comercial de Rotashield[®], mostrando-se altamente protetora contra gastroenterite grave por RVA, sendo posteriormente licenciada pelo *Food and Drugs Administration* (FDA) dos EUA. Três doses da vacina eram administradas via oral em crianças de 2, 4 e 6 meses de idade. Entretanto, em 1999, devido à associação com intussuscepção (um tipo de obstrução intestinal) a vacina foi retirada do mercado (CDC, 1999; Murphy *et al.*, 2001).

A relação entre Rotashield[®] e intussuscepção não interrompeu a busca por uma vacina segura e eficaz contra os RVA, e quase uma década após a continuação dos estudos de pesquisa clínica ocorreu o advento de dois outros imunizantes: vacina oral atenuada de origem humana (Rotarix[®], GlaxoSmithKline, Bélgica) e vacina pentavalente de origem bovino-humana (Rotateq[®], Merck & Co. Inc., USA).

Não obstante os extensos estudos de fase III indicando elevada eficácia e nítida segurança de ambas as vacinas ora licenciadas é de suma importância que análises no

tocante à efetividade vacinal pós-licenciamento, monitoramento da circulação de genótipos virais após o uso da vacina em larga escala, bem como a vigilância pós-comercialização dos eventos adversos graves sejam realizadas, conforme preconizado pela Organização Mundial de Saúde (WHO 2007; Widdowson *et al.*, 2009).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. HISTÓRICO

A pesquisadora Ruth Bishop *et al* (1973) ao analisar seções ultrafinas da mucosa duodenal de crianças com diarreia por meio da microscopia eletrônica, descreveu pela primeira vez os RVA. Concomitantemente, Flewett *et al* (1973), na Inglaterra, e Middleton *et al* (1974), no Canadá, encontraram vírus semelhantes em extratos fecais e fragmentos de biópsia e aspirados duodenais. A evidenciação de dupla camada proteica em sua estrutura determinou a subsequente denominação *Duovírus*. O termo rotavírus, derivado do latim, foi posteriormente consagrado devido ao aspecto radiado de suas partículas (Flewett *et al.*, 1973). Esse evento ampliou a elucidação da etiologia viral nas gastroenterites agudas.

No Brasil, o primeiro registro dos RVA associados aos quadros diarreicos infantis ocorreu em Belém, Pará, em 1976, a partir de investigações envolvendo pacientes sob tratamento em um ambulatório público de pediatria (Linhares *et al.*, 1977). Estudos subsequentes em outras regiões do país consubstanciaram a relevância que assumem esses agentes virais na gênese das gastroenterites infantis agudas (Candeias *et al.*, 1978; Coiro *et al.*, 1983; Pereira *et al.*, 1983).

Em pouco tempo os RVA foram reconhecidos como o agente capaz de causar diarreia grave em várias espécies de aves e mamíferos jovens e identificados como o agente envolvido em 73% das hospitalizações por diarreia durante o inverno, em crianças australianas no período de 1974 a 1975 (Davidson *et al.*, 1975).

2.2. AGENTE ETIOLÓGICO

Os RVA pertencem à família *Reoviridae* e se constituem no gênero *Rotavírus*. Imagens baseadas em micrografia eletrônica e procedimentos cristalográficos evidenciam que a partícula infecciosa exibe simetria icosaédrica, de aproximadamente 100 nm de diâmetro e não possuem envelope. Oito espécies de rotavírus (A a H) são registrados, mas somente os dos grupos A, B e C foram descritos em humanos. Os RVA são os que mais frequentemente infectam os seres humanos (Hyser & Estes, 2009; Greenberg e Estes, 2009)

O vírus é composto por seis proteínas estruturais (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 e VP7) que formam três camadas concêntricas, quais sejam, capsídeo externo, intermediário e interno e outras seis proteínas não estruturais (NSP1-NSP6). A camada interna envolve o core, que contém em seu interior o genoma viral constituído por 11 segmentos de ácido ribonucleico com cadeia dupla (double-stranded RNA - dsRNA), além da enzima transcriptase e das proteínas VP1, VP2 e VP3 (Figura 1). Cada um dos segmentos do genoma viral “codifica” a síntese de uma proteína viral (VP, “viral protein”) específica, exceto o segmento 11 que codifica duas: NSP5 e NSP6. A camada intermediária é constituída pela proteína VP6, presente em maior quantidade. O capsídeo externo é formado pelas proteínas VP7 (780 moléculas/vírion) e VP4 (60 dímeros ou trímeros), as quais basicamente definem o genótipo viral (Ramig, 2004; Estes e Kapikian, 2007).

As proteínas (VP4 e VP7) são ambas responsáveis pela indução de anticorpos específicos neutralizantes (Greenberg e Estes, 2009). O antígeno VP7, determinante dos sorotipos **G**, é uma glicoproteína que representa 30% da superfície do capsídeo externo, compondo uma base de onde emergem cerca de 60 projeções de dímeros ou trímeros da proteína VP4, componente antigênico que é sensível à protease e associada aos sorotipos **P** (Yoder e Dormitzer, 2006).

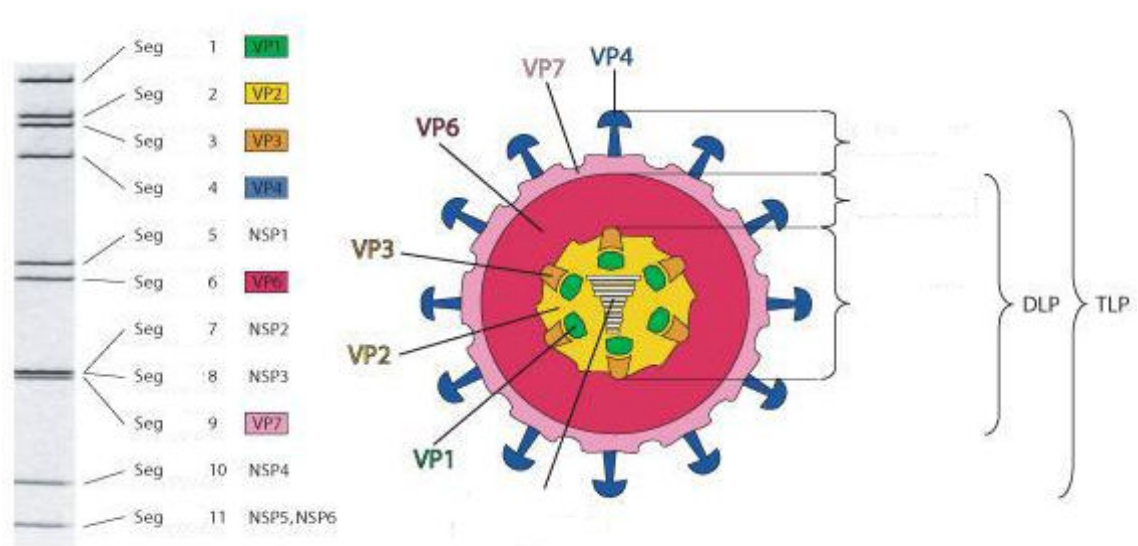


Figura 1 – Representação esquemática da partícula completa rotavírus

Entre as proteínas não estruturais sintetizadas pelo RVA no interior de células infectadas, destaca-se a NSP4, glicoproteína transmembrana sintetizada no retículo endoplasmático e que tem importante papel na morfogênese e replicação do vírus (Hyser e Estes, 2009). É sintetizada pelo gene 10 e considerada atualmente como a única proteína viral a funcionar como uma enterotoxina capaz de induzir diarreia de caráter secretor. O potencial patogênico da NSP4 estaria associado à sua capacidade de alterar a homeostase do Ca^{2+} intracelular, tanto em células infectadas, quanto nas não infectadas (Zambrano *et al.*, 2012).

Os segmentos genômicos que codificam as proteínas G e P dos RVA podem combinar-se diferentemente, daí advindo grande diversidade genética, com a possibilidade de 133 diferentes combinações G e P (WHO, 2009). Para o RVA do grupo A, cinco genótipos G (G1, G2, G3, G4 e G9) associados aos sorotipos P[8], P[4] e P[6] definem as amostras denominadas usuais, com as combinações G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8] e G9P[8] correspondendo a 88% das amostras analisadas em todo o mundo (Santos e Hoshino, 2005; Bányai *et al.*, 2012). Até o momento são descritos 27 genótipos G (G1-G26) e 35 genótipos P (P[1]-P[35]) (Matthijnssens *et al.*, 2011).

Uma das características mais importantes do RVA é sua propriedade de se manter viável no ambiente sob diferentes condições, resistindo a amplas variações de temperatura e pH (pH entre 3 e 10), mantendo seu potencial infeccioso mesmo quando submetido à temperatura ambiente (Meng *et al.*, 1987). Fisher *et al.* (2002) demonstraram que amostras de fezes armazenadas em temperatura ambiente, entre 30° C e 35°C, durante dois meses e meio, continham partículas de RVA estáveis e potencialmente infecciosas.

A nomenclatura vigente aplicada à classificação binária das amostras de rotavirus compreende, em sequência, as especificidades G e P [sorotipo (se disponível) e genótipo entre colchetes]. Recentemente, foi proposta uma nova classificação para os RVA, baseada no sequenciamento completo do genoma viral, que leva em consideração os 11 genes virais, identificando genótipos específicos para cada um dos onze segmentos genômicos (Matthijnssens *et al.*, 2008).

Os rearranjos genéticos podem acontecer durante infecções mistas *in vivo* e *in vitro*, e possibilitam o surgimento de amostras com características não usuais ou incomuns. Distintos antigenicamente dos tipos humanos, os rotavírus de animais eventualmente são capazes de infectar o homem. Essa transmissão entre espécies origina novos genótipos com potencial para produzir doença. Em Belém, relato de caso em recém nascido hospitalizado com diarreia adquirida na comunidade, documentou pela primeira vez no Brasil a cepa NB-150, procedente de rearranjo entre genes humano e suíno (Mascarenhas *et al.*, 2007).

2.3. EPIDEMIOLOGIA

Os RVA são enteropatógenos de distribuição universal e os principais agentes causadores de gastroenterite aguda grave em crianças nos primeiros cinco anos de vida (Velázquez *et al.*, 1996; WHO, 2013). A morbidade é elevada tanto em países desenvolvidos quanto naqueles em desenvolvimento. Entretanto, nesses últimos, a dificuldade de acesso ao atendimento médico para corrigir a desidratação causada pela doença e o estado nutricional nem sempre adequado do paciente contribuem para os elevados índices de mortalidade (Girard *et al.*, 2006; Kotloff *et al.*, 2013).

Globalmente, os RVA são responsáveis por aproximadamente 453.000 óbitos (IC95%: 420.000-494.000), em crianças menores de cinco anos de idade (Tate *et al.*, 2012). Cerca de 80% dos óbitos ocorre em países da Ásia e África sub-saariana, onde recentemente se realizou estudo caso-controle, prospectivo, denominado “GEMS” (Global Enteric Multicenter Study) destacando os RVA como principal agente etiológico causador de gastroenterite aguda, especialmente nos primeiros dois anos de idade, faixa etária com maior número de óbitos (Kotloff *et al.*, 2013).

O mecanismo de transmissão mais frequente é o da via fecal-oral, diretamente de pessoa a pessoa ou, indiretamente, através de fômites, a partir dos indivíduos infectados. Para tanto concorre a presença de até 10^{12} partículas virais por grama do espécime fecal (Ward *et al.*, 1986; WHO, 2007). Há evidências sugerindo que a transmissão também possa ocorrer através da via respiratória, o que não implicaria, entretanto, em replicação no trato respiratório (Gray *et al.*, 2008).

A infecção primária pelo RVA costuma ser a mais grave, acreditando-se que sucessivas infecções promovam imunidade cumulativa conferindo caráter mais brando às infecções subsequentes. Estudo conduzido por Velázquez *et al* (1996) demonstrou que duas infecções naturais consecutivas, sintomáticas ou assintomáticas, determinam proteção contra diarreia moderada e grave por RVA, e sugere que crianças maiores e adultos geralmente experimentam reinfecções mais leves ou assintomáticas, embora permaneçam excretando o vírus e podendo transmiti-lo às pessoas susceptíveis (Anderson e Weber, 2004).

Aproximadamente 50% das crianças infectadas elimina as partículas virais infecciosas antes do início das manifestações clínicas, com um terço delas mantendo a excreção viral por até sete dias após o término dos sintomas (Sengupta *et al.*, 2009). Em pacientes imunodeprimidos a eliminação do vírus nas fezes pode persistir por várias semanas, mesmo na ausência de diarreia, facilitando a sua disseminação na comunidade e no ambiente hospitalar (Gusmão *et al.*, 1995; Widdowson *et al.*, 2000; Cunliffe *et al.*, 2001).

Com efeito, a infecção hospitalar por RVA é um problema frequente e de significativas proporções. Nos Estados Unidos, 25% das hospitalizações por esse vírus, ou aproximadamente 16.000-18.000 internações a cada ano se associam a infecções adquiridas dentro de hospitais (Fischer, Breese e Glass, 2004). Na Europa ocidental, infecções nosocomiais causadas por RVA representaram 47% a 69% de todas as diarreias adquiridas no hospital, prolongando o tempo de internação da criança para até 12 dias (Ogilvie *et al.*, 2012).

A epidemiologia da infecção por RVA é um fenômeno complexo e sujeito a mudanças, devido à sua substancial diversidade genética (O’Ryan, 2009). Múltiplas investigações demonstram que vários sorotipos/genótipos podem co-circular numa mesma comunidade a cada ano, embora um determinado tipo prevaleça amplamente sobre os demais, concorrendo com até 50% do total em circulação (Estes e Kapikian, 2007). Há ainda evidências de que um determinado genótipo possa predominar durante 1-2 anos, emergindo a partir de então uma nova variedade antigênica dominante (Kapikian *et al.*, 2001; Iturriza-Gomara *et al.*, 2003). Atualmente, cinco genótipos G (G1, G2, G3, G4 e G9) são considerados usuais por sua larga distribuição em todos os continentes (Santos e Hoshino, 2005; O’Ryan, 2009; Bányai *et al.*, 2012).

A complexa epidemiologia do RVA é demonstrada por grandes variações geográficas e temporais na circulação das diversas genótipos, especialmente nos países em desenvolvimento. Santos e Hoshino (2005) relataram 70% de casos relacionados ao G1P[8] na América do Norte, enquanto o tipo G8 na África e o G5 na América Latina mostraram-se mais importantes epidemiologicamente.

Bányai *et al* (2012) documentaram que a emergência global dos genótipos G9 e G12 acompanhou-se de declínio do G1 e da reemergência do G3 a partir do ano 2000.

Nos países de clima temperado a infecção por RVA exhibe uma sazonalidade típica, com predomínio nos meses mais secos (outono-inverno), sendo identificada a circulação de até quatro a cinco genótipos concomitantemente (Cook *et al.*, 1990; LeBaron *et al.*, 1990; Ryan *et al.*, 1996). Diferentemente, nos países em desenvolvimento, de clima tropical, a transmissão do RVA acontece durante todo o ano, com um ou dois períodos de circulação mais intensa nos meses mais secos e uma grande diversidade de amostras que circulam simultaneamente (Cook *et al.*, 1990; Cunliffe *et al.*, 1998; Bernstein, 2009).

2.4. PATOGÊNESE

A patogênese da infecção por RVA ainda não está completamente elucidada, porém envolve fatores relacionados ao vírus propriamente dito e ao hospedeiro, que interagem definindo a gravidade clínica e o desfecho da doença. O sítio de replicação primária dos RVA é o epitélio do intestino delgado, mais especificamente os enterócitos maduros, com função digestiva e absorptiva, que recobrem o topo das microvilosidades da mucosa duodenal (Estes e Kapikian, 2007; Dennehy, 2008; Gray *et al.*, 2008).

Após a ingestão, as partículas infecciosas presentes no lúmen intestinal se acoplam a receptores expressos na superfície dos enterócitos diferenciados. Estes receptores, representados por ácido siálico, integrinas, e outras, ligam-se às proteínas virais VP8 e VP5, possibilitando a adsorção do vírus à célula e subsequente penetração (López e Arias, 2004).

Dentro da célula, sob a ação de enzimas lisossomais, o RVA perde seu capsídeo externo ao mesmo tempo em que ocorre ativação da transcriptase viral desencadeando a

síntese de proteínas necessárias à replicação do vírus. As proteínas recém-formadas e o RNA viral concentram-se no citoplasma da célula hospedeira em estruturas especializadas denominadas viroplasmas, onde ocorrerá a replicação do RNA viral de dupla fita (dsRNA) e a montagem de novas partículas virais (Ramig, 2004; Estes e Kapikian, 2007; Greenberg e Estes, 2009).

A proteína viral NSP4 atua como receptor viral intracelular que ao interagir com a VP4 e VP6 possibilita o brotamento das partículas virais para o retículo endoplasmático, além de exercer papel fundamental no aumento da concentração de $[Ca^{2+}]$ ao estimular a liberação do Ca^{2+} armazenado no retículo endoplasmático através de um mecanismo dependente da fosfolipase C (Tian *et al.*, 1995). O RVA é capaz de modular a homeostase do Ca^{2+} , elevando em pelo menos três vezes os níveis de $[Ca^{2+}]_i$, e em até dez vezes a capacidade de absorção de Ca^{2+} pela célula, estabelecendo um ambiente favorável à sua replicação (Brunet *et al.*, 2000; Ruiz *et al.*, 2000).

A eliminação de novos *virions* ocorre principalmente pela lise da célula infectada, considerando-se ainda a liberação de partículas por uma via não clássica, através da porção apical da membrana plasmática dos enterócitos (Ramig, 2004; Greenberg e Estes 2009).

As alterações histopatológicas, primariamente localizadas no intestino delgado, caracterizam-se por poucas lesões à microscopia óptica e de gravidade variável, desde a vacuolização do enterócito até o grave comprometimento do epitélio com atrofia das vilosidades e hiperplasia das criptas (Estes e Kapikian, 2007).

Na maioria dos casos não há qualquer correlação entre a gravidade clínica e as alterações histopatológicas encontradas, o que sugere o envolvimento de diferentes mecanismos na gênese das diarreias associadas ao RVA, acreditando-se atualmente na participação de componentes determinantes de má-absorção e outros secretores (Widdowson *et al.*, 2005; Greenberg e Estes, 2009).

A má-absorção é secundária à extensa destruição de enterócitos diferenciados pela ação direta do vírus e tem como consequência imediata a redução na expressão das dissacaridases, principalmente da lactase, com prejuízo à digestão e absorção de nutrientes. Disso resulta conteúdo luminal composto principalmente por carboidratos mal digeridos, de elevada osmolaridade, o que favorece o afluxo de água e eletrólitos

para a luz intestinal (diarreia osmótica). Além disso, a lise dos enterócitos que revestem as microvilosidades ocasiona a proliferação de células imaturas das criptas, com função secretora, agravando os distúrbios hidroeletrólíticos (Widdowson *et al.*, 2005; Gray *et al.*, 2008).

A diarreia secretora é atribuída à ação da proteína viral NSP4 liberada a partir de enterócitos maduros infectados das células da cripta. Postula-se também que essa enterotoxina seja responsável pela ativação do sistema nervoso entérico (Tafazoli *et al.*, 2001; Greenberg e Estes, 2009).

2.5. IMUNOLOGIA

Em resposta a uma infecção natural por RVA estão envolvidos componentes da imunidade inata e adquirida (Dennehy 2007; Gray *et al.* 2008). Estudos em modelos animais têm sido especialmente importantes para incrementar o entendimento da imunidade nas infecções por RVA. Diversos estudos sugerem que os anticorpos neutralizantes dirigidos às proteínas VP4 e VP7 são indutores de proteção (Dennehy, 2007; Ward, 2008; Desselberger e Huppertz, 2011).

A primeira infecção por RVA (natural ou induzida por vacina) resulta em resposta imune de caráter predominantemente homotípico, mediada por anticorpos contra as proteínas VP7 e VP4. Nos processos infecciosos subsequentes (reinfecções), entretanto, o espectro de resposta ampliado assume caráter heterotípico ou de proteção cruzada, uma vez que RVA de genótipos G distintos reservam entre si proteínas idênticas dos pontos de vista sorológico e genotípico, fator potencialmente determinante da proteção heterotípica (Velázquez *et al.*, 1996; Ward *et al.*, 2008).

Níveis séricos de anticorpos IgM, IgG e IgA contra RVA são detectados após a infecção natural. A detecção de IgM sérica ocorre no sétimo dia após a infecção natural ou vacinação, enquanto a IgA e a IgG elevar-se-iam após o vigésimo dia (Bricks, 2005; Ward *et al.*, 1986). A IgA presente no lúmen intestinal, devido ao fenômeno de transudação, reflete os níveis séricos dessa imunoglobulina. Estima-se maior proteção conferida por anticorpos intestinais contra a doença causada por RVA comparada aquela advinda dos anticorpos circulantes produzidos por ocasião da doença (Ward *et al.*, 2008).

Os linfócitos B parecem envolvidos na produção dos anticorpos específicos IgA e IgG, induzindo proteção contra a doença subsequente. Os linfócitos citotóxicos T CD8+ e CD4+, por sua vez, promoveriam a resolução do quadro infeccioso (Dennehy, 2007; Angel *et al.*, 2007; Ward *et al.*, 2008).

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

Em pacientes imunodeprimidos, a infecção natural por RVA em geral não está associada à ocorrência de quadros graves de diarreia, embora a excreção viral possa apresentar-se prolongada.

Estudos *in vivo* e *in vitro* sugerem a participação da imunidade inata na infecção por RVA. O fato de que a recuperação dos sintomas da doença ocorre em média durante a primeira semana, período no qual não há ainda efetiva produção de anticorpos em níveis protetores, reforça a provável atuação de mecanismos inatos. Isso inclui a substituição de enterócitos maduros por células imaturas da cripta, menos suscetíveis ao vírus, aumento do peristaltismo intestinal e especialmente a atividade do interferon, que atua na inativação do vírus (Offit, 1996; Greenberg e Estes, 2009).

A elevação dos níveis séricos de interferon I e II foi documentada em crianças e animais infectados por rotavírus, limitando a infecção e o surgimento da diarreia. (Barro e Patton, 2007).

Apesar dos avanços obtidos nos últimos anos, permanecem ainda muitas dúvidas e controvérsias sobre como ocorreriam os mecanismos imunes responsáveis pela resolução da doença e pelo estabelecimento de uma imunidade protetora (Desselberger e Huppertz, 2011).

2.6. QUADRO CLÍNICO

A infecção pelo RVA possui espectro clínico variado, observando-se desde formas assintomáticas e subclínicas, comumente descritas em neonatos e adultos contactantes de crianças infectadas, até quadros graves que evoluem com desidratação,

choque, desequilíbrio eletrolítico e óbito (Estes e Kapikian, 2007; (Giaquinto *et al.*, 2007; WHO, 2013).

Os sintomas clássicos da gastroenterite por RVA são febre, vômitos e diarreia, que podem se apresentar de forma combinada ou isoladamente e manifestam-se mais frequentemente em crianças com idades entre seis meses e dois anos (Bernstein, 2009; Salvadori *et al.*, 2010). Estudo envolvendo 1.359 crianças canadenses hospitalizadas com infecção por RVA demonstrou que 60% delas tinham até dois anos de idade, e a maioria (69%) apresentava os três sintomas associados (Le Saux *et al.*, 2010).

Após um período de incubação de aproximadamente 48 horas, a doença se inicia com o aparecimento súbito de vômitos e febre que geralmente precedem a diarreia em 24-48 horas (Davidson *et al.*, 1975). Mais de um terço das crianças com gastroenterite por RVA evolui com febre acima de 39°C e, em muitos casos, os vômitos são o primeiro sintoma apresentado podendo manifestar-se como incoercíveis, levando à rápida desidratação.

Pode-se observar ainda diarreia com fezes de consistência semilíquida ou pastosa, contendo muco. Entretanto, a presença de sangue nas fezes é incomum e sugere associação com outros patógenos de caráter invasivo (Borade *et al.*, 2010).

A redução da atividade da lactase, secundária ao dano produzido pelos RVA na mucosa intestinal, induz ao aparecimento de diarreia osmótica, caracterizada por evacuações frequentes de fezes líquidas volumosas, explosivas e de odor fétido, acompanhadas de distensão abdominal e cólicas. Borade *et al.* (2010) relataram que 73% de crianças indianas evoluíram com intolerância à lactose durante episódio diarreico associado ao RVA.

A desidratação de intensidade moderada a grave é a complicação mais frequente durante a gastroenterite por RVA, levando à necessidade de reidratação endovenosa e maior tempo de permanência no hospital (Johansen *et al.*, 2008; Le Saux *et al.*, 2010).

Perl *et al.* (2011) descreveram ocorrência significativamente maior de vômitos, desidratação e letargia em crianças com amostras de fezes positivas para RVA quando comparadas àquelas com diarreia de outra etiologia, ressaltando que 92% daquelas com gastroenterite causada por esse enteropatógeno realizaram reposição endovenosa de fluidos.

Os distúrbios eletrolíticos e metabólicos podem estar presentes em quadros de desidratação grave. Há registros de hipocalcemia com típicas alterações eletrocardiográficas, hipoglicemia e particularmente hipernatremia, podendo ocasionar a necessidade de cuidados de terapia intensiva e hospitalização prolongada (Perl *et al.*, 2011, Kaiser *et al.*, 2012).

As convulsões são as manifestações neurológicas descritas com maior frequência em crianças com diarreia por RVA. Recentes relatos têm apontado o RVA como o agente viral mais comumente associado às convulsões afebris benignas e podem ocorrer até o terceiro dia de doença (Cancho-Candela *et al.*, 2009; Patteau *et al.*, 2010; Youssef *et al.*, 2011). Na maioria das vezes são crises convulsivas tônico-clônicas generalizadas, podendo ser focais inicialmente, únicas ou agrupadas em 3 a 6 episódios nas 24hs seguintes à primeira convulsão. Esses episódios duram entre trinta segundos a dez minutos e podem manifestar-se em crianças previamente saudáveis entre seis meses e três anos de idade, sem evidências de qualquer alteração laboratorial, incluindo, líquido cefalorraquidiano, dosagem sérica de eletrólitos, glicemia, eletroencefalograma e exames de imagens normais (Hung *et al.*, 2003; Youssef *et al.*, 2011).

Nos últimos anos, relatos de casos de crianças que apresentaram complicações neurológicas durante episódio de gastroenterite aguda pelo RVA foram registrados em vários países, além da identificação de RNA do RVA no líquido cefalorraquidiano daquelas que evoluíram com convulsões, encefalites, meningoencefalites e cerebelites (Lynch *et al.*, 2001; Dickey *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2009). A maioria dos pacientes apresentou prognóstico favorável e recuperação total; entretanto, foram descritos casos de evolução prolongada com déficits neurológicos residuais e até mesmo morte (Lynch *et al.*, 2001).

Os sintomas gastrointestinais têm evolução autolimitada e duram em média três a sete dias, podendo, entretanto, em alguns casos, persistir por até duas a três semanas, com relatos da ocorrência de diarreia protraída, mesmo em crianças imunocompetentes (Sood e Booth, 1999; Gray *et al.*, 2008; Salvadori *et al.*, 2010; Das *et al.*, 2012).

2.7. ANTIGENEMIA E VIREMIA NAS INFECÇÕES POR ROTAVÍRUS

Blutt *et al.* (2003) documentaram pela primeira vez a elevada prevalência de antígenos e RNA de RVA no sangue de crianças e animais com diarreia. Atualmente, se considera que a antigenemia seja manifestação frequente, ocorrendo em 64% a 95% das crianças durante a fase aguda da gastroenterite associada ao RVA. Embora os níveis de antígeno e RNA virais encontrados no sangue sejam muito menores do que aqueles observados nas fezes, questiona-se o papel desse achado na determinação de doença mais grave (Fisher *et al.*, 2005; Ray *et al.*, 2006; Sugata *et al.*, 2007; Ramani *et al.*, 2010).

A antigenemia seria considerada uma etapa natural e silenciosa da infecção aguda por RVA, talvez fator determinante na gravidade das manifestações clínicas, especialmente naqueles países onde existe elevada taxa de mortalidade associada a condições imunossupressoras, como a desnutrição (Ray *et al.*, 2006). No entanto, relatos de possível infecção por RVA em sítios extraintestinais não se tem limitado a pacientes imunodeprimidos, sendo identificados também entre crianças imunocompetentes e animais infectados experimentalmente (Crawford *et al.*, 2006; Ray *et al.*, 2006; Patel *et al.*, 2010).

Estudo em animais demonstrou que a replicação do RVA no intestino seria anterior ao aparecimento do antígeno e do RNA viral no sangue (Blutt *et al.*, 2003). A intensa replicação viral produziria maiores danos no epitélio intestinal, o que favoreceria a disseminação do vírus via corrente sanguínea. Ramani *et al.* (2010) encontraram antigenemia em 50,4% (56/111) das amostras de soro de crianças com gastroenterite por RVA e em 2,4% (1/44) das amostras naquelas com infecção assintomática, demonstrando antigenemia significativamente maior naquelas diarreicas. Chitambar *et al.* (2008), analisando 31 amostras pareadas de crianças com diarreia por RVA notaram elevada correlação entre a presença de RNA nas fezes e no soro.

Por outro lado, a presença de RNA no sangue foi registrada mesmo na ausência de excreção do RVA nas fezes, o que seria sugestivo de que a replicação viral estivesse ocorrendo em outros locais, que não o intestino delgado (Chitambar *et al.*, 2008; Blutt *et al.*, 2007).

A imunidade do hospedeiro parece ter uma importante relação com os níveis de antigenemia. Presume-se que anticorpos circulantes adquiridos por via transplacentária ou após exposição prévia ao RVA facilitarão a remoção dos antígenos e “dsRNA” viral circulantes no sangue, reduzindo a possibilidade de replicação sistêmica do vírus (Ray *et al.*, 2006).

Estudos apontam que crianças com maiores níveis séricos de IgA e IgG contra o RVA tiveram menos antigenemia (Ray *et al.*, 2006; Blutt *et al.*, 2007). Fujita *et al.* (2010), pesquisaram amostras de 16 crianças com diarreia por rotavírus e relataram que em quatro delas menores de seis meses, com RNA no sangue, não foi detectada a antigenemia, achado que poderia estar relacionado à proteção conferida por anticorpos maternos.

O nível das citocinas também tem sido relacionado à ocorrência de antígenos na corrente sanguínea. Sugata *et al.* (2007) identificaram que crianças com antigenemia significativa apresentavam níveis elevados de interleucina 8, que exerce um papel importante no estímulo à resposta imune de mucosa. A par disso, a interleucina 10, com função reguladora de linfócitos T e do processo inflamatório, mostrou uma correlação negativa com a antigenemia. Recente estudo mostrou um aumento na proporção de células dendríticas ativadas nos primeiros dois a quatro dias de infecção por RVA, aparentemente correlacionado aos níveis de antigenemia (Moon *et al.*, 2012).

Dados disponíveis até o momento mostram que a detecção da antigenemia é muito mais frequente em crianças com diarreia, correlacionando-se a presença do antígeno viral no soro com a fase aguda da infecção pelo RVA (Ray *et al.*, 2006; Chitambar *et al.*, 2008; Patel *et al.*, 2010). Níveis máximos de antígenos no sangue foram detectados no segundo dia de doença, havendo declínio progressivo até o sexto dia quando se tornam geralmente indetectáveis (Sugata *et al.*, 2007). Não parece haver um genótipo viral específico associado à maior ocorrência de antigenemia (Sugata *et al.*, 2007; Ahmed *et al.*, 2013). Ao analisar o soro dos pacientes com agente viral positivo nas fezes Justino *et al.* observou antigenemia em 40% (14/35) deles. Ao submeter 34 das 35 amostras de soro à reação em cadeia da polimerase precedida da transcrição reversa (RT-PCR) foi demonstrada positividade em 64,7% (22/34) das amostras (Justino *et al.*, 2013).

Estudos relacionando antigenemia à gravidade das manifestações clínicas nas infecções por RVA ainda são limitados. Ray *et al.* (2006) e Ramani *et al.* (2010), relataram que crianças com antigenemia apresentavam escores de gravidade clínica mais elevados. No Brasil, em Belém, Pará, estudo recente envolvendo 124 pares de amostras fecais e de soro coletadas de pacientes hospitalizados com gastroenterite aguda e RVA detectado nas fezes, por método de ensaio imunoenzimático, observou-se graus de intensidade “muito grave” (escore ≥ 15 na escala de Ruuska e Vesikari (1990) mais frequentemente nos pacientes positivos para o antígeno viral no soro.

Nesse trabalho, Justino *et al.*, 2013 demonstraram que o antígeno de rotavírus/RNA no soro apresentou correlação estatisticamente significativa ($P < 0,007$) com a presença de febre ($\geq 37,5^{\circ}\text{C}$). Sugata *et al.* (2007) também detectaram maiores níveis de antígeno no sangue de pacientes com febre, ao contrário de Fujita *et al.* (2010) que, apesar de não identificarem qualquer associação entre febre e antigenemia, demonstraram correlação com a ocorrência de convulsões durante a evolução clínica.

Os achados descritos na literatura sobre antigenemia e circulação sistêmica dos RVA podem contribuir substancialmente para a melhor compreensão acerca da patogênese e evolução clínica da infecção por esse vírus e influenciar no controle e prevenção das gastroenterites agudas na infância ao avaliar de forma mais precisa o impacto alcançado pela vacinação (Patel *et al.*, 2010).

2.8. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

O diagnóstico laboratorial específico e precoce é fundamental para se evitarem condutas terapêuticas inadequadas como a utilização desnecessária de antibióticos na vigência do tratamento, além de ensejar o repasse fidedigno dos dados aos sistemas oficiais de vigilância epidemiológica.

A técnica mais utilizada para o diagnóstico das gastroenterites por RVA é a identificação do antígeno viral nas fezes através do ensaio imunoenzimático ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), que utiliza anticorpos policlonais ou monoclonais visando a detecção da proteína VP6, espécie A específica. Trata-se de procedimento bastante sensível, existindo diversos kits comerciais disponíveis no

mercado que são de fácil utilização e baixo custo, permitindo avaliar várias amostras simultaneamente (Hjelt *et al.*, 1987; Thouless *et al.*, 1977; Linhares *et al.*, 2010).

Outro método importante na rotina diária, também baseado na captura do antígeno VP6 é o teste de aglutinação com partículas de látex. Este teste utiliza suspensão contendo microesferas de látex sensibilizadas com anticorpos monoclonais para a proteína VP6, que sofrem processo de aglutinação ao entrar em contato com amostras contendo o antígeno viral. Com sensibilidade comparável a do ELISA, porém menor especificidade, a aglutinação em látex é um teste de menor custo, sendo apontada como a técnica mais indicada para uso em hospitais e ambulatórios pela rapidez na obtenção do resultado (Brandt *et al.*, 1987; Pai *et al.*, 1985; Raboni *et al.*, 2002).

A eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) demonstra a presença do dsRNA viral nas fezes. Constitui-se em técnica de elevada especificidade e permite diferenciar os perfis eletroferotipos em “longo”, “curto” e “supercurto”, assumindo importância epidemiológica, já que avalia melhor a diversidade dos RVA circulantes e pode contribuir para a definição de uma provável fonte comum em surtos. Herring *et al.*, 1982; Kapikian *et al.* In: Knipe *et al.*, 2001; Pereira *et al.*, 1983).

A microscopia eletrônica (ME) foi o primeiro método empregado para a detecção do RVA nas fezes, possui elevada especificidade e permite obter-se rápido resultado, entretanto, requer equipamentos de elevado custo, além de profissionais altamente qualificados para sua realização, sendo reservada a centros de pesquisa (Desselberger & Flewett, 1993; LeBaron *et al.*, 1990).

2.9. TRATAMENTO

Atualmente, não existem medicamentos antivirais disponíveis para tratar a doença diarreica causada pelo RVA. Desta maneira, o tratamento da gastroenterite aguda por RVA baseia-se na hidratação oral ou parenteral para prevenção ou correção da desidratação, além do estabelecimento da alimentação (Bernstein, 2009). O Relatório da OMS em 2009 aponta que somente 39% das crianças menores de cinco anos que desenvolvem diarreia nos países em desenvolvimento recebem o tratamento recomendado: terapia de reidratação oral (TRO) e alimentação continuada (WHO, 2009).

A manutenção da alimentação para crianças com diarreia sem desidratação, especialmente o leite materno, assim como a retomada da dieta regular poucas horas após reidratação, facilita a recuperação da mucosa intestinal após a infecção pelo RVA reduzindo o tempo de duração da doença (Dennehy, 2013). A reidratação deve ser feita preferencialmente através da TRO, mesmo na presença de vômitos, quando o soro oral será oferecido em pequenas quantidades a intervalos curtos. Entretanto, a reposição endovenosa de água e eletrólitos pode ser necessária face à presença de vômitos incoercíveis. Wildi-Runge *et al* (2009), analisando a hospitalização de 608 crianças com diarreia por RVA, identificaram que em 70% dos pacientes foi administrada a hidratação via parenteral.

A partir de 2004, a OMS vem orientando o uso de sais de reidratação (SRO) de baixa osmolaridade durante a TRO. A nova fórmula possui menor osmolaridade (245 mOsm/l) graças à redução das concentrações de sódio (75 mEq/l), cloro (65 mEq/L) e glicose (75 mOsm/l), em comparação com o soro padrão (90 mEq/L de sódio, 80 mEq/l de cloro, 111 mosm/l de glicose e osmolaridade total de 311 mosm/l). Com isso ocorre redução do número de evacuações e dos vômitos, reduzindo-se a necessidade da terapia de reidratação venosa em 33% dos casos (WHO, 2009).

Apesar da recomendação formal da OMS para uso do SRO de baixa osmolaridade desde 2009, a adoção desta medida ocorreu somente em 66 países até então. No Brasil, os SRO distribuídos gratuitamente em todo o território nacional ainda mantêm a antiga composição (WHO, 2009).

A nitazoxanida, agente antimicrobiano indicado para o tratamento de helmintos e protozoários, vem sendo aventada como possibilidade terapêutica a ser adotada em gastroenterite causada por RVA, entretanto apenas dois estudos que avaliaram o uso da nitazoxanida em crianças com rotavirose foram publicados nos últimos dez anos e envolveram um total de 113 participantes (Dennehy, 2013). Rossignol *et al* (2006) e Teran *et al* (2009) relataram que a administração de nitazoxanida em suspensão oral na dose de 15 mg/kg/dia duas vezes ao dia, durante três dias, reduziu significativamente a duração da diarreia e o tempo de hospitalização em crianças com gastroenterite causada por RVA. Diante da pouca evidência científica dos possíveis benefícios de sua utilização, a nitazoxanida necessita ter sua aplicação na prática clínica diária avaliada

critérios, não sendo recomendada para o tratamento das diarreias causadas por rotavírus.

2.10. PREVENÇÃO E CONTROLE

Dentre as medidas gerais indicadas para a prevenção e controle das doenças diarreicas agudas de qualquer etiologia destacam-se o incentivo ao aleitamento materno precoce e exclusivo até o sexto mês de vida, a lavagem das mãos, o consumo de água tratada, o acesso ao saneamento básico e a oferta de tratamento adequado para as crianças doentes (WHO, 2013). Apesar de fundamentais, tais medidas parecem ter alcance limitado na diarreia associada aos RVA, frente ao enorme impacto da doença. O uso de vacinas efetivas, capazes de proteger a criança particularmente contra as formas moderadas e graves da gastroenterite por RVA, representa a principal estratégia para a redução da morbidade e mortalidade associada a esse enteropatógeno (Atherly *et al.*, 2012).

A administração de vacinas com genótipos atenuadas por via oral, em uma fase inicial da vida, pretende simular uma primeira infecção natural e dessa forma, induzir a imunidade protetora (Widdowson *et al.*, 2005).

A primeira vacina contra o RVA, a RotaShield[®] (vacina oral, tetravalente, com cepa atenuada de origem símio-humana, Wyeth Lederle Vaccines (Philadelphia) foi licenciada nos Estados Unidos em 1998, e retirada do mercado americano em poucos meses, depois que ficou demonstrada sua associação com o aumento do número de casos de intussuscepção entre as crianças vacinadas (1 caso para cada 10.000 vacinados) (Murphy *et al.*, 2001; Myers *et al.*, 2002;). A intussuscepção é uma condição potencialmente fatal, caracterizada por invaginação intestinal, o que leva a um quadro obstrutivo caracterizado clinicamente por dor abdominal intensa, fezes com muco e sangue, vômitos e massa abdominal palpável.

Apesar do desconhecimento sobre como a vacina poderia levar ao aumento do número de casos de intussuscepção, postula-se que esse fenômeno possa estar relacionado ao uso de vacinas contendo vírus vivos atenuados em sua formulação para uso oral (Jiang *et al.*, 2008). A experiência com a vacina RotaShield[®] tornou rotineiro o monitoramento desse evento adverso grave em potencial nos diversos países que

adotaram a vacinação contra o RVA em seus programas de imunização (Chen *et al.*, 2012).

Duas vacinas orais, envolvendo genótipos atenuadas, encontram-se atualmente recomendadas e licenciadas, pela OMS, atualmente no mundo: a Rotarix® (GlaxoSmithKline Biologicals, Belgium), uma vacina monovalente de origem humana, e a RotaTeq® (Merck & Co. Inc., USA), pentavalente de origem bovino-humana. Informações referentes à segurança e eficácia de outras vacinas denominadas Lanzhou (composta por rotavírus de origem animal e fabricada para uso apenas na China) e Rotavin-M1 (G1P[8] atenuada, no Vietnam), ainda são pouco disponíveis (Fu C *et al.*, 2007; Dang *et al.*, 2012; WHO, 2013).

2. 10. 1. Vacina monovalente (Rotarix®)

A vacina oral atenuada de origem humana, produzida pela GlaxoSmithKline Biologicals (GSK), contém o sorotipo G1P8, derivado da amostra 89-12, originalmente isolada de uma criança naturalmente infectada por RVA após clonagem e passagens sucessivas em culturas celulares, daí advindo a amostra vacinal propriamente dita RIX4414 (Angel J *et al.*, 2007, Chevart *et al.*, 2009). Os estudos de fases II e III conduzidos na América Latina, incluindo o Brasil (Belém, Pará), envolveram aproximadamente 100.000 crianças, e demonstraram níveis protetores médios de 85% contra gastroenterite grave e hospitalizações por RVA (Ruiz-Palacios *et al.*, 2006). A vacina também apresentou elevada eficácia em prevenir gastroenterite de qualquer gravidade causada pelo tipo predominante G1 (92%) e os sorotipos G3, G4 e G9 (88%). No que se refere a hospitalizações devidas a gastroenterite de qualquer etiologia, evidenciou-se proteção de 42% (Ruiz-Palacios *et al.*, 2006).

Ainda no contexto dos estudos de fase III na América Latina, um subgrupo (n= 15.183) foi acompanhado até os dois anos de idade para avaliar a manutenção da eficácia, a qual alcançou 80,5%. O acompanhamento durante o segundo ano também corroborou os achados prévios quanto à inexistência de eventos adversos graves, em particular a intussuscepção (Ruiz-Palacios *et al.*, 2006; Linhares *et al.*, 2008). Ressalte-se que a proteção contra hospitalizações por GE causada por RVA e outros agentes etiológicos foi de 83% e 40%, respectivamente (Linhares *et al.*, 2008). No Brasil, o

Instituto Evandro Chagas, (Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde) em Belém, Pará, participou desses estudos de fase III com o recrutamento e inclusão de 3.218 crianças para avaliação de eficácia e segurança da vacina Rotarix®, sendo um subgrupo de 630 delas acompanhado até os dois anos de idade observando-se eficácia protetora contra gastroenterite grave por RVA de 70,5% (IC95% 28,9-89,3) e de 35,7% (IC95% 5,8-56,5) frente à gastroenterite grave e a de qualquer etiologia (Justino *et al.*, 2012).

Na Europa, Omenñaca *et al* (2012) avaliaram a imunogenicidade em termos de imunoglobulina A da Rotarix® em prematuros, evidenciando-se 76% a 88% de conversões sorológicas nos grupos relacionados às idades gestacionais entre 27-30 semanas e 31-36 semanas, respectivamente, consolidando a recomendação de uso a essas crianças. Análises secundárias recentes na América Latina e Europa reúnem evidências de que um esquema vacinal incompleto (uma dose apenas) confere proteção de 89,8% e 62,5%, respectivamente, apesar de ocorrer em níveis inferiores à observada em crianças que receberam o esquema vacinal completo (López *et al.*, 2006; Vesikari *et al.*, 2006). Também na Europa, estudos envolvendo o acompanhamento de gêmeos na mesma família detectaram amostra viral da vacina em pelo menos um espécime fecal entre 18,8% daqueles que receberam placebo, sugerindo transmissão horizontal decorrente da imunização em larga escala com a vacina monovalente (Rivera L *et al.*, 2011).

No Brasil, a Rotarix®, foi introduzida no Programa Nacional de Imunizações em março de 2006, onde é denominada de Vacina Oral de Rotavírus Humano (VORH). É administrada em duas doses, a primeira a partir de 1 mês e 15 dias até 3 meses e 7 dias, e a segunda dose, de 3 meses e 7 dias até 5 meses e 15 dias, respeitando-se as faixas etárias preconizadas (Ministério da Saúde. 2006).

2. 10. 2. Vacina pentavalente (Rotateq®)

A vacina Rotateq® é constituída de amostras de RVA geneticamente reestruturadas, desenvolvidas a partir de estirpes de origem humana e bovina, contendo quatro delas expressão das proteínas VP7 (G1, G2, G3, G4) em combinação com a VP4, P[8] assumindo composição final pentavalente. A Rotateq® é administrada em três

doses, aos 2, 4 e 6 meses, sendo a primeira entre 6-12 semanas, e as subsequentes a intervalos de 4-10 semanas, completando-se o esquema até o máximo de 32 semanas (Yen *et al.*, 2011; WHO, 2013).

Um extenso estudo voltado à eficácia dessa vacina pentavalente evidenciou índices protetores de 74% contra diarreias em geral e 96% e 93%, se considerados os atendimentos ambulatoriais e as hospitalizações, respectivamente (Vesikari *et al.*, 2006). Estudos de segurança envolvendo mais de 70.000 crianças, em particular nos EUA e na Europa, onde metade das crianças recebeu vacina, não evidenciaram aumento do risco de intussuscepção, comparativamente ao grupo que recebeu placebo.

Estudos indicam que a administração da Rotateq[®] concomitantemente à vacina oral de poliovírus (VOP) resulta em médias geométricas dos títulos de anticorpos séricos IgA discretamente inferiores àqueles obtidos, se utilizadas tais vacinas separadamente (Ciarlet *et al.*, 2008).

Do ponto de vista da segurança, os dados oferecidos pelos estudos de fase III caracterizam a Rotateq[®] como efetivamente segura e bem tolerada. Com efeito, não se observou qualquer incremento no risco de intussuscepção entre as crianças vacinadas, comparativamente àquelas do grupo placebo (Vesikari *et al.*, 2006). Tais achados consubstanciaram seu licenciamento em fevereiro de 2006 pelo “FDA” para uso em crianças nos EUA.

Recente revisão não evidenciou diferenças quanto a eventos adversos importantes entre as vacinas Rotarix[®] e RotaTeq[®] demonstrando que as mesmas apresentam elevada eficácia e segurança, mesmo em países onde há expressiva diversidade das amostras virais circulantes. Ambas as vacinas são capazes de induzir resposta imune satisfatória, inclusive em crianças positivas para o HIV (Steele *et al.*, 2011; Soares-Weiser *et al.*, 2012; WHO, 2013).

Soares-Weiser *et al* (2012) demonstraram maior eficácia das vacinas monovalente e pentavalente contra diarreia grave por RVA nos países com menor taxa de mortalidade (proteção de cerca de 85% e 75%, respectivamente), comparativamente aos países em desenvolvimento, e elevada mortalidade (proteção de cerca de 42% e 41%, respectivamente) durante os dois primeiros anos de vida.

A despeito de menor eficácia, a aplicação de vacinas nos países com elevado impacto da doença grave e óbitos associados ao RVA incorreria em resultado significativo, evitando que um grande número de crianças evolua com doença grave e fatal. Estimativas do número de casos preveníveis de doença por RVA na África do Sul e Ásia com a vacina monovalente (6,7 casos/100 pessoas/ano na República do Malawi e 4,2 casos/100 pessoas/ano na África), e com a vacina pentavalente (2,7 casos/100 pessoas/ano na África e 3,3 casos/100 pessoas/ano na Ásia), foram superiores àquelas registradas na América Latina e na Europa (Yen *et al.*, 2011).

2. 10. 3. Vigilância de intussuscepção após o advento das vacinas licenciadas

Estudos de vigilância realizados após o licenciamento das vacinas Rotarix[®] e RotaTeq[®], detectaram aumento discreto no risco de intussuscepção (1-2/100.000 crianças vacinadas) especialmente no período de 1-7 dias após a primeira dose (WHO, 2013). Patel *et al.* (2011), analisando dados de 615 crianças do México e do Brasil relataram incremento anual de 96 casos de intussuscepção, sendo cinco fatais, relacionados à vacina monovalente. Descreveram ainda, que em crianças brasileiras, se observou maior risco de intussuscepção entre o primeiro e sétimo dia após a segunda dose da vacina Rotarix[®].

Nos Estados Unidos, dois grandes estudos avaliaram o risco de intussuscepção associado à vacinação com a RotaTeq[®]. O primeiro comparou o risco de intussuscepção com a vacina RotaTeq[®] (n=85.397) e DTP acelular (n=62.820), encontrando 6 e 5 casos respectivamente, dentro de 30 dias após a vacinação, correspondendo a um risco relativo de intussuscepção de 0,8% (IC 95%: 0,2-3,52) (Loughlin *et al.*, 2012). O segundo, que incluiu 786.725 doses de RotaTeq[®] administradas no período de 2006-2010, não evidenciou risco estatisticamente significativo, durante os primeiros 7 e 30 dias após a aplicação da vacina pentavalente (Shui *et al.*, 2012).

Apesar da existência do risco de intussuscepção com ambas as vacinas licenciadas, os benefícios advindos do número de hospitalizações e de óbitos evitados por esses imunizantes suplantam os riscos relatados nos referidos estudos (WHO, 2007).

2. 10. 4. Vacinas contra rotavírus em perspectiva

Novas perspectivas para o desenvolvimento de vacinas contra os RVA incluem três amostras virais atenuadas oriundas de neonatos, naturalmente menos virulentas, quais sejam, **RV3**, **116E** e **I321**, todas ainda em estágios incipientes de avaliação (Cunliffe *et al.*, 2002; WHO & GAVI, 2001). A **RV3** reserva especificidade antigênica P[6]G3, compreendendo RVA naturalmente atenuado que se mostrou endêmico em berçários na Austrália de 1975 a 1985. Estudos preliminares demonstraram tratar-se de vacina inócua quanto a possíveis reações adversas, além do caráter moderadamente imunogênico (conversões sorológicas situadas na faixa de 35% a 58%) (Cunliffe *et al.*, 2002; WHO e GAVI, 2001; Danchin *et al.*, 2013). As amostras **116E** e **I321** foram isoladas na Índia, ambas obtidas de recém-nascidos e ora sob avaliação quanto à imunogenicidade e “segurança” entre adultos e crianças. A primeira vacina (**116E**) pertence ao genótipo P[11]G10, com isolamento inicial em Bangalore; a segunda (I321), ora destituída de importância em face de resultados insatisfatórios recentes, denota especificidade P[11]G9. Ambas parecem oferecer proteção frente à reinfeção sintomática por RVA, além de a **116E** induzir a produção de IgA específica, detectada na secreção salivar, em 70% das crianças vacinadas (Chen *et al.*, 2012; Taneja e Malik, 2012).

Um grupo de vacinas reunindo preparações virais inativadas ora se encontra em estágio incipiente de investigação. Em geral se obtêm esses imunizantes a partir de procedimentos da biologia molecular, preconizando-se a sua administração via parenteral, via intranasal, parenteral e cutânea como possível estratégia para afastar o risco de intussuscepção ao reduzir a replicação viral diretamente no intestino delgado (Crawford *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2001; García-Díaz *et al.*, 2004; Jiang *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2010; Moon *et al.*, 2013). Recentes experimentos envolvendo modelos suínos e murinos demonstraram resultados preliminares satisfatórios no tocante à resposta imune à eficácia (Bertolotti-Ciarlet *et al.*, 2013; Nguyen *et al.*, 2003).

A esperança é de que essas novas vacinas mostrem-se seguras, eficazes, e também mais viáveis economicamente aos países de baixa renda, onde a proteção conferida pela vacina é uma necessidade urgente, diante das elevadas taxas de mortalidade associadas à gastroenterite por RVA (Armah *et al.*, 2010).

2. 10. 5. Efetividade das vacinas licenciadas

Estudos de efetividade, que avaliam a eficácia vacinal em condições reais, realizados em países da Europa e das Américas, têm demonstrado que a vacinação promove uma redução sustentada na morbidade e mortalidade associadas aos RVA, além da evidência quanto a benefícios indiretos como possível proteção coletiva em crianças mais velhas e adultos não vacinados (Boom *et al.*, 2010; Buttery *et al.*, 2011; Carmo *et al.*, 2011; Desai *et al.*, 2011).

Na Austrália, a vacina contra RVA foi introduzida em outubro de 2006. Devido a um surto do tipo G9 ocorrido em comunidades indígenas 6 meses após a introdução da vacina, Snelling *et al.* (2009) realizaram um estudo caso-controle retrospectivo detectando efetividade vacinal de 84,5% (IC95%: 23-97%) contra a hospitalização por RVA. A elevada proteção alcançada em condições reais frente ao tipo G9, mediante cobertura parcial da vacina naquela ocasião, revelou-se de grande importância.

Na América Central, em El Salvador, a vacinação com a Rotarix[®] também foi introduzida em outubro de 2006. No período compreendido entre 2007 e 2009, De Palma *et al.* (2010) demonstraram efetividade vacinal de 76% (IC95%: 64-84%) em estudo caso-controle envolvendo 323 casos hospitalizados por gastroenterite causada por RVA pareados com 969 controles domiciliares (1:3), corroborando os achados revelados pelo presente estudo.

Na Bélgica, a efetividade vacinal demonstrada em outro estudo caso-controle foi de 90% (IC95%: 81-95%) alcançando proteção de 85% (IC95%: 64-94%) contra o tipo G2P[4] e 95% (IC95%: 78-99%) contra G1P[8] (Braeckman *et al.*, 2012).

A efetividade da Rotarix[®] frente a um tipo de RVA completamente distinto da composição vacinal monovalente G1P[8], reserva particular interesse face à re-emergência natural do sorotipo G2P[4] na América Latina, Europa, Ásia, África e Austrália (Kirkwood *et al.*, 2008; Leite *et al.*, 2008; Nakagomi *et al.*, 2008; Munford *et al.*, 2009; Antunes *et al.*, 2009; Gurgel *et al.*, 2009; Carvalho-Costa *et al.*, 2009; Dey *et al.*, 2009; Hasing *et al.*, 2009; Sáfadi *et al.*, 2010; Linhares *et al.*, 2011).

Nos Estados Unidos, dados do *Centers for Disease Control and Prevention* [(CDC), 2008] mostraram uma redução de 50% na magnitude da temporada de maior incidência de diarreia por RVA, que teve seu início atrasado em 2-4 meses, no período

de 2007-2008, em comparação com as quinze estações anteriores (1991-2006), ressaltando a importância de estudos de vigilância para monitorar impactos futuros da vacina sobre a epidemiologia dos RVA.

A vigilância dos diferentes tipos de RVA circulantes no ambiente após a introdução da vacina é importante para a identificação de amostras emergentes, que eventualmente possam decorrer de uma teórica pressão exercida pela imunidade homotípica em longo prazo. Além disso, estudos pós-licenciamento são de fundamental importância para o monitoramento de possíveis efeitos adversos, e com vistas à avaliação do impacto vacinal nas populações atendidas, tanto nos países desenvolvidos quanto naqueles em desenvolvimento, daí derivando dados que subsidiarão as decisões e políticas de saúde pública (Chen *et al.*, 2012).

Atualmente se encontram disponíveis para uso em mais de 120 países, as vacinas Rotarix[®] e RotaTeq[®], recomendadas pela OMS para inclusão nos programas nacionais de imunização em todo o mundo, desde 2009, após a divulgação dos dados de eficácia dessas vacinas em países da África e Ásia (Armah *et al.*, 2010; Vesikari *et al.*, 2006). Entretanto, apenas 47 nações adotaram essa prática, com destaque para os países da América Latina, dentre eles o Brasil, pioneiro na introdução da vacina em seu Programa Nacional de Imunizações (Linhares e Justino, 2011).

2.11. COBERTURA DA VACINA ORAL CONTRA ROTAVÍRUS HUMANO NO BRASIL

Em março de 2006 o Brasil foi o primeiro país na América Latina a adotar em seu Programa Nacional de Imunizações (PNI) a vacinação contra RVA para todas as crianças, em esquema de duas doses, aos 2 e 4 meses de idade, administradas juntamente com as outras vacinas preconizadas para esta faixa etária (Ministério da Saúde, 2006).

De acordo com dados oficiais do Programa Nacional de Imunizações, ao longo dos anos que se seguiram após a introdução da vacina, a cobertura aumentou progressivamente, entretanto sempre esteve abaixo da meta pré-estabelecida pelo Ministério da Saúde do Brasil (acima de 90%), variando de 79% a 86.3% entre 2007 e

2011, respectivamente. No primeiro ano de uso a cobertura foi de apenas 46.5%, uma vez que então se estabelecia a vacinação em âmbito nacional (Ministério da Saúde, 2013).

Ao comparar-se a cobertura alcançada pela vacina oral contra rotavírus humano à da tetravalente DTP+HiB, observa-se diferença entre ambas com esta última atingindo coberturas superiores à estimada pelo Ministério da Saúde (>95%). Apesar disso, essa diferença entre ambos os imunizantes tem diminuído progressivamente caindo de 23,5% em 2006 para 12.5% em 2011, podendo corresponder à melhoria na adesão ao esquema vacinal com a VORH (Ministério da Saúde, 2013).

Um dos possíveis fatores que interferem no alcance da meta de cobertura estipulada para a vacina contra RVA refere-se ao rígido limite etário de administração das doses, sendo preconizada a primeira entre 6 e 14 semanas de idade, e a segunda até 24 semanas, com intervalo mínimo de 30 dias entre ambas. Tais limites etários impõem aos profissionais de saúde maior atenção e conhecimento em relação à vacina contra RVA, não sendo possível administrá-la a crianças que tenham sofrido atraso no recebimento das outras vacinações de rotina, as quais possuem intervalos menos rígidos para sua efetivação (do Carmo *et al.*, 2011; Flannery *et al.*, 2013).

A restrição imposta à faixa etária para administração da vacina contra RVA deve-se aos limites preconizados nos ensaios clínicos pelo potencial risco de intussuscepção, aumentado quando administrada a crianças acima de 12 semanas de idade de acordo com estudos envolvendo a Rotashield[®], primeira vacina contra RVA (CDC, 1999; Simonsen *et al.*, 2001)

Ao comparar-se a cobertura da vacina contra RVA entre as macrorregiões do Brasil, observa-se nítido declínio nas regiões norte e nordeste, comparando-as às outras, possivelmente devido a fatores limitantes como dificuldades na compreensão dos limites etários preconizados para sua administração por parte dos técnicos de saúde, deficiências na rede de armazenamento e distribuição da vacina (Ministério da Saúde, 2013).

Desde janeiro de 2013 o Ministério da Saúde do Brasil estendeu o limite para completar a imunização (segunda dose) contra RVA para 32 semanas de idade, obedecendo à recomendação da OMS, como estratégia visando ao maior alcance da

imunização completa, principalmente naquelas crianças sob maior risco de morbidade e mortalidade pela gastroenterite causada por RVA (Patel *et al.*, 2009; WHO, 2012; Ministério da Saúde, 2013).

2.12 GENÓTIPOS CIRCULANTES DE ROTAVÍRUS ANTES E APÓS A INTRODUÇÃO DAS VACINAS CONTRA ROTAVÍRUS

A circulação de genótipos de RVA apresenta grande variabilidade ao longo dos anos em diferentes regiões do globo terrestre (Santos e Hoshino, 2005; O’Ryan *et al.*, 2009). Estudos de vigilância das amostras dos RVA circulantes, realizados antes e após o licenciamento de ambas as vacinas licenciadas, têm monitorado o surgimento de configurações genotípicas usuais não usuais.

Após a implementação da vacina contra o RVA pelo PNI em 2006, observou-se um aumento notável na prevalência de amostras de rotavirus G2P[4] em todo o País, o que levou alguns pesquisadores a postular a ocorrência de pressão seletiva induzida pela vacina monovalente (O’Ryan *et al.*, 2011; Gurgel *et al.*, 2007; Nakagomi *et al.*, 2008). Essa mudança na distribuição dos RVA no Brasil foi particularmente evidente durante 2007-2009, ocorrendo simultaneamente com predominância o genótipo G2P[4] em alguns outros países latino-americanos e, surpreendentemente, naqueles que não haviam introduzido a Rotarix® em seu setor público como a Nicarágua, a qual utiliza a vacina pentavalente (Rotateq®), e a Argentina que ainda não adotou a imunização contra RVA no setor público de saúde (Patel *et al.*, 2009; Esteban *et al.*, 2010; O’Ryan *et al.*, 2011; Lopman *et al.*, 2012).

Estudos mais recentes no Brasil têm mostrado um declínio acentuado na prevalência de circulação de RVA G2P[4] e um aumento concomitante nas taxas de G1P[8] e outras linhagens, favorecendo uma hipótese alternativa de que os genótipos de RVA podem flutuar tanto temporal quanto geograficamente (Carvalho-Costa *et al.*, O’Ryan, 2009).

Estudos de vigilância centrados na distribuição temporal de genótipos de RVA no Brasil têm sido realizados desde o final da década de 1980 e início da de 1990 (Linhares *et al.*, 2011). Até o momento três estudos de revisão em vários estados no Brasil

permitiram a comparação entre a prevalência dos tipos de RVA durante períodos pré e pós-vacinação.

Uma primeira revisão avaliou a diversidade de genótipos de RVA em sete estados localizados na região Norte do Brasil ao longo de um período de 27 anos antes (1981-2005) e após (2006-2008) a introdução da vacina em âmbito nacional (Oliveira *et al.*, 2012). O genótipo G2 apresentou um padrão cíclico típico de ocorrência ao longo do tempo, gerando taxas de prevalência relativamente tão altas quanto 91% em 2006 e mantendo-se predominante até 2008. Os RVA de especificidade G1 foram detectados ao longo de todo o período de estudo, o que representa > 40 % das amostras detectadas. O genótipo G9, emergente globalmente, surgiu entre 1998-2000 e foi predominante (42,0 % dos isolados) durante um extenso surto de gastroenterite que ocorreu em Rio Branco no Acre (Siqueira *et al.*, 2010).

Leite *et al.* (2008) realizaram estudo para determinar a distribuição de genótipos de RVA em 13 estados pertencentes a todas as cinco regiões brasileiras no período de 1982-2007. No total, esta revisão incluiu 2.691 amostras de rotavirus-positivos, das quais 2.492 obtidas durante o período pré- vacinação (1982-2005) e 199 após a implementação da vacina contra o RVA no setor público (2006-2007). Notadamente, o genótipo G2P[4] tornou-se predominante durante o período após a introdução da vacina contra o RVA (2006-2007) no Brasil, respondendo por 74 % das amostras analisadas, em contraste com padrão de anterior de ocorrência (1982-2005) quando as taxas de prevalência variavam de 26% (1982-1995) para 2% (1996-2005). Além disso, denotava-se a presença dos genótipos circulantes clássicos G1- G4 durante 1982-1995, com notável prevalência de 9% do G5P[8], em particular na região do Sudeste do país. No período pré- vacinação subsequente de 1996-2005, linhagens G9P[8] emergiram seguindo uma tendência de circulação global (Leite *et al.*, 2008; Oliveira *et al.*, 2012).

Carvalho-Costa *et al.* (2009) realizaram extensa revisão, baseada em dados de estudos de vigilância laboratorial, que incluiu 1.242 amostras de RVA positivas coletadas em 18 estados nas cinco regiões do Brasil no período compreendido entre 2005-2009. Eles demonstraram que o genótipo G2P[4] reapareceu como dominante nesse período, que se seguiu à introdução da vacina no Brasil, com taxas de prevalência relativa entre 49% a 85%. Mais recentemente, a prevalência do tipo G2 declinou representando 66 % das genótipos, em 2007, 85% em 2008 e somente 37,5% em 2009.

No ano de 2005 (o ano de introdução pré- vacina), as genótipos G9 foram predominantes, representando taxas tão altas quanto 85 %, resultado compatível com os de outros estudos realizados no Brasil e em outros países (Carvalho-Costa *et al.*, 2011; Linhares *et al.*, 2011).

Além dos estudos de vários estados acima mencionados, cerca de dez pesquisas realizadas em todo o Brasil também demonstraram aumento marcante na prevalência relativa de G2P[4] durante o primeiro ano pós- introdução da Rotarix® (Gurgel *et al.*, 2008; Sáfadi *et al.*, 2010; Morilo *et al.*, 2010; Borges *et al.*, 2011; Cilli *et al.*, 2011; Luchs *et al.*, 2011; Dulgheroff *et al.*, 2013).

Na Europa, em Portugal, tanto a vacina monovalente (Rotarix®) quanto a pentavalente (Rotateq®) foram licenciadas para uso em maio de 2006. Com o objetivo de monitorar a circulação de amostras virais, Rodrigues *et al.* (2010) conduziram no período de 2006 a 2009 um estudo que demonstrou a predominância (90%) do tipo G9P[8] em 2006; 41% de G3P[8] em 2008 e 62% G1P[8] em 2009. O tipo G2P[4] não foi detectado em 2006 e concorreu somente com 22% das amostras em 2007 e 31% em 2008. Assinale-se, contudo, que a cobertura vacinal naquela ocasião era de apenas 15-35%.

Na Austrália a vacina Rotarix® foi licenciada em 2006 sendo observado por Kirkwood *et al* (2011) o tipo G2P[4] em 72% dos episódios diarreicos entre os anos de 2008 e 2009.

Estudos pós-licenciamento de ambas as vacinas na Bélgica (a partir de 2006) com cobertura vacinal superior a 95%, evidenciaram flutuação de 32 a 38% na circulação do genótipo G2P[4] (Braeckman *et al.*, 2012).

Embora os estudos anteriormente descritos sugiram mudança na distribuição de genótipos de RVA após a introdução da vacina, quase invariavelmente, denotando um aumento na detecção de G2P[4], faz-se necessário determinar se tal fenômeno decorre de mudança induzida pela vacina ou reflete uma natural flutuação de tipos dominantes ao longo dos anos.

2.13. IMPACTO DAS VACINAS CONTRA ROTAVIRUS NA MORBIDADE

Após o uso em larga escala das vacinas contra RVA em diversos países, estudos foram conduzidos para avaliar o impacto desse imunizante sobre a morbidade, particularmente expressa no número de hospitalizações por gastroenterite.

O número de hospitalizações por diarreia causada por RVA após o uso da Rotarix[®] na Bélgica (2006), onde se registrava cobertura vacinal de 88%, reduziu em 35-66% ao analisar-se o período compreendido entre 1986 e 2009. Também se observou atraso e encurtamento no período de maior frequência das gastroenterites por RVA (Zeller *et al.*, 2010). Resultados similares foram publicados por Braeckman *et al* (2011), ainda na Bélgica, ao avaliar o período entre 1999 e 2010 sendo observada redução em três vezes no número dos casos positivos para RVA e atraso de 4 a 6 semanas no pico quanto à incidência da doença naquele país. Na Áustria, Paulke-Korinek *et al* (2010) observaram redução de 70% nas hospitalizações por gastroenterite causada por RVA entre crianças menores de 1 ano, desde o licenciamento das vacinas em 2007.

Na Austrália, onde ambas as vacinas encontram-se licenciadas desde 2007, também se observou redução de 50% para 20% nas hospitalizações e visitas a setores de urgência e emergência, bem como no tempo da permanência hospitalar devido a episódios diarreicos causados por RVA (Buttery *et al.*, 2011). Macartney *et al* (2011) também observaram 87% de redução no número das infecções nosocomiais causadas por este agente viral.

Estudos conduzidos por Molto *et al* (2011), no Panamá, demonstraram redução de 22-37% nas hospitalizações em crianças com idades inferiores a 5 anos, inclusive naquelas não elegíveis para receber a vacina. Observou-se também atraso e diminuição no período de maior incidência da doença naquele país. No México, a redução nas hospitalizações por RVA foi de 11-40%, especialmente entre menores de 2 anos de idade, enquanto que em El Salvador houve redução de 69-81% naquelas crianças com idade abaixo dos 5 anos (Quintanar-Solares *et al.*, 2011; Yen *et al.*, 2011).

No Brasil, cinco estudos de vigilância foram conduzidos: um em Sergipe, um no Paraná, e três em regiões diferentes, em escala nacional para avaliar o impacto da VORH nas hospitalizações e consultas associadas à diarreia em crianças. Em Sergipe,

Centenari *et al.* (2010) compararam o número de consultas por diarreia de todas as causas e de hospitalizações em crianças menores de 2 anos nos períodos pré- (2004-2006) e pós- (2006-2008) introdução da VORH. Usando coeficientes de regressão para medir o impacto da vacina sobre as consultas ambulatoriais e de internações por diarreia, tendências decrescentes foram estatisticamente significativas apenas após a introdução da vacina.

O estudo de vigilância passiva realizada no Paraná, comparou as taxas de incidência de internações associadas a gastroenterite durante os períodos pré- (1998-2005) e pós (2006-2008) vacinação, evidenciando diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) em lactentes e crianças menores de um ano de idade apenas. O impacto da vacina não foi evidente entre crianças de 1-4 anos (Rissardo *et al.*, 2010).

Os três estudos adicionais de vigilância passiva em âmbito nacional foram conduzidos para avaliar o impacto da vacinação contra o RVA no número de internações por gastroenterite entre crianças < 5 anos. O primeiro estudo foi essencialmente uma análise retrospectiva dos dados que foram recolhidos a partir de vários sistemas de vigilância no Brasil com o objetivo de avaliar as tendências de internações hospitalares por todas as causas de diarreia em crianças menores de 5 anos durante um período de 8 anos (2002 - 2009). Usando regressões lineares para comparar as tendências antes e após a introdução da vacina, uma diminuição global nas hospitalizações foi observada porém com declínio mais acentuado durante o período pós-introdução da vacina, em comparação com o período (Gurgel *et al.*, 2011).

O segundo estudo utilizou análises de séries temporais onde foram estimadas as taxas de hospitalização relacionadas com diarreia durante o período pós- vacinação (2007-2009) com base nas taxas esperadas, calculados a partir do período pré- vacina (2002-2005). No geral, houve uma queda de 17% sobre as admissões esperadas em todo o país, com as taxas de redução mais elevadas - na faixa de 21 % a 25 % - entre as crianças com idade < 2 anos (Do Carmo *et al.*, 2011). Nesse estudo, estimou-se um total acumulado de 130 mil menos internações entre crianças < 5 anos durante a era pós-vacinal.

O terceiro estudo de vigilância passiva relatou as tendências em todas as causas GE em crianças < 5 anos antes (1998-2005) e depois (2006 e 2007) a introdução da vacina contra o RVA no setor público no Brasil (Lanzieri *et al.*, 2010). Entre as crianças

que estavam em idade elegível para a vacinação contra o RVA, hospitalizações por todas as causas de gastroenterite diminuíram 25,8% e 48,2 %, em 2006 e 2007, respectivamente, em comparação com o período pré- vacinação. Além disso, detectou-se declínio significativo (19,1%) das internações por todas as causas de gastroenterite em crianças mais velhas (1 a 4 anos de idade) em 2007, em comparação com o período pré-vacinação, sugerindo benefícios indiretos dessa imunização.

De 2004 a 2008 Sáfadi *et al.* (2010) realizaram vigilância ativa de base hospitalar para todas as causas de gastroenterite e - RVA para avaliar o impacto da vacinação contra o RVA entre crianças com menos de 5 anos em São Paulo. Na comparação entre os períodos pós- (2007-2008) e pré- (2004-2005) vacinação, as taxas de redução de 59% e 29% foram observados no número de hospitalizações por RVA e por todas as causas de gastroenterite, respectivamente. A descoberta notável foi a queda significativa nas proporções de testes RVA positivas entre as crianças <5 anos e crianças hospitalizadas por gastroenterite aguda: 42,2% e 69,2 %, respectivamente.

Os estudos resumidos acima demonstram que a vacinação contra o RVA tem consistentemente demonstrado o seu impacto na redução de internações hospitalares por GE em todo o Brasil. Além disso, esta diminuição das internações hospitalares tornou-se mais evidente para gastroenterite relacionada aos rotavirus, tendo em vista as estimativas de um estudo realizado em São Paulo (Sáfadi *et al.*, 2010). De relevância foi a constatação de que a diminuição das internações hospitalares por GE também foi observada entre as crianças mais velhas, não elegíveis para vacinação, o que sugere um efeito de proteção de rebanho.

2.14. IMPACTO DAS VACINAS CONTRA ROTAVIRUS NA MORTALIDADE

Em 2009 a OMS recomendou o uso de vacinas licenciadas contra RVA em todos os países, especialmente naqueles com elevados índices (>10/100.000 habitantes) de mortalidade associada a gastroenterite por este agente viral. Contudo, até o momento tais vacinas ainda não fazem parte da rotina de imunizações de diversos países da África e da Ásia que necessitam do apoio da GAVI (*Global Alliance for Vaccines and Immunization*) para sua introdução (Tate *et al.*, 2011).

Munos *et al* (2010) realizaram revisão sistemática envolvendo cerca de 20 estudos que avaliavam a eficácia e efetividade das vacinas contra RVA nos Estados Unidos, Europa e América Latina, com vistas a confirmar o impacto desses imunizantes na mortalidade causada por RVA. O efeito estimado na mortalidade foi de 74% (35-90%) em crianças menores de 5 anos de idade.

Na América Latina, diversos países utilizam em seu sistema público de saúde as vacinas contra RVA. Desai *et al* (2011) avaliaram estudos de efetividade após a introdução da vacina e detectaram redução da mortalidade por gastroenterite que variou de 22-41%.

No México, Richardson *et al* (2010) ao compararem os índices de mortalidade por diarreia de qualquer etiologia entre os anos de 2003 e 2009, pré e pós-introdução da vacina contra RVA no país, observaram redução de 35% devido à diarreias em geral.

No Brasil, observou-se redução de 22-39% da mortalidade devido a gastroenterites em menores de 2 anos e redução de 33% em crianças entre 1 e 4 anos de idade em 2008 (do Carmo *et al.*, 2011; Lanzieri *et al.*, 2011). Estima-se que entre 2007 e 2009, ocorreram 1.500 mortes a menos que o esperado entre crianças abaixo de cinco anos, com redução significativamente maior entre lactentes (Lanzieri *et al.*, 2011). Gurgel *et al.* (2011) recentemente, realizaram, análise ecológica, retrospectiva, dos dados dos sistemas oficiais de vigilância no Brasil para avaliar o impacto da utilização generalizada de vacinação contra o RVA na mortalidade por diarreia infantil. Entre as crianças com idade <1 ano o número de mortes diminuiu 50 % na comparação entre o período pré- (2002-2005) e pós- (2006-2009) vacinação, que correspondem a 986 e 449 mortes, respectivamente. Declínio significativo na mortalidade (32,9%) também foi observado em crianças na faixa etária de 1-4 anos: 237 crianças e 150 mortes relacionadas com a diarreia, respectivamente.

É de suma importância avaliar e atualizar as estimativas de mortalidade relacionada aos RVA, inclusive por faixa etária acometida, para medir o efeito das vacinas e possíveis mudanças na diversidade de RVA circulantes após o seu uso em larga escala.

3. JUSTIFICATIVA

A VORH foi introduzida no calendário oficial de vacinação do Brasil no início de março de 2006, sendo o primeiro país latino-americano a utilizar a vacina em larga escala no setor público. Desde a sua introdução, 13.357.702 doses foram administradas até o final de 2008. As duas doses são administradas juntamente com a primeira e a segunda dose da vacina pólio oral, aproximadamente aos 2 e 4 meses de idade.

Em 2007, a OMS recomendou enfaticamente que estudos de vigilância pós-comercialização envolvendo as vacinas licenciadas fossem conduzidos para monitorar o impacto na morbidade e na mortalidade das gastroenterites causada por RVAI, quando a vacina é administrada em condições reais (fora dos ensaios clínicos) na população.

Durante a última década, estudos de natureza epidemiológica e de pesquisa clínica com vacina envolvendo os RVA foram conduzidos no Instituto Evandro Chagas, em Belém, conferindo ao centro larga experiência no desenvolvimento de projetos de pesquisa nessa área, com resultados consistentes no tocante às fases II e III dos ensaios clínicos com a vacina VORH.

A avaliação da efetividade vacinal na população por meio de estudos clínicos de fase IV possibilitou a verificação da eficácia da vacina em condições reais tanto em crianças que receberam o esquema completo de imunização contra RVA, quanto naqueles que receberam somente uma dose ou que não foram imunizados, permitindo também a avaliação da taxa de “cobertura” vacinal entre as crianças incluídas no estudo.

Adicionalmente, foi possível analisar a intensidade clínica da gastroenterite causada por RVA, comparada à situação vacinal quanto a VORH entre os pacientes incluídos no estudo, tanto através do escore de Ruuska & Vesikari quanto mediante cada sintoma apresentado na vigência da gastroenterite, permitindo análise inédita nesse aspecto até o momento.

No período estudado também foi possível realizar o monitoramento da circulação de genótipos de RVA em Belém, Pará, após o uso da VORH em larga escala no sistema público de saúde do País, atendendo a recomendação da OMS.

Os dados gerados por esse estudo serão úteis para gestores e administradores em saúde pública no tocante à avaliação custo-efetividade da vacinação com a VORH no

País, especialmente na região Norte (Belém, Pará) onde os índices de morbidade e mortalidade por doença diarreica causada por RVA ainda representam expressivo problema de saúde pública.

4. OBJETIVOS

4.1 GERAL

Estimar a efetividade da vacinação completa (duas doses) com VORH (Rotarix[®]) na prevenção da gastroenterite grave por RVA entre crianças nascidas após 6 de março de 2006 e que têm pelo menos 12 semanas de idade, hospitalizadas em quatro clínicas/hospitais na área de Belém.

4.2 ESPECÍFICOS

- Estimar a efetividade da vacinação incompleta (uma dose) em prevenir a hospitalização por gastroenterite grave causada por RVA entre crianças nascidas após 6 de março de 2006.

- Estimar a proporção de hospitalização devido à gastroenterite grave causada por RVA entre todas as admissões ocorridas.

- Determinar a distribuição das admissões por gastroenterite grave causada por rotavirus segundo a idade da criança e o mês do ano.

- Determinar os genótipos circulantes de RVA que ocasionaram gastroenterite grave durante o período do estudo.

- Correlacionar a intensidade clínica dos episódios de gastroenterite grave causada por RVA, de acordo com o escore de Ruuska & Vesikari (1990), com a situação vacinal do sujeito incluído no estudo.

- Correlacionar a intensidade clínica dos episódios de gastroenterite grave causada por RVA, de acordo com cada sintoma apresentado, com a situação vacinal do sujeito incluído no estudo.

5 MÉTODOS

A descrição dos métodos está inserida nos artigos I, II e III.

6 RESULTADOS

Os resultados foram descritos nos artigos I, II e III abaixo enumerados.

6.1 ARTIGO I

Título: *Effectiveness of the monovalent G1P[8] human rotavirus vaccine against hospitalization for severe G2P[4] rotavirus gastroenteritis in Belém, Brazil.*

Periódico: *The Pediatric Infectious Disease Journal*, publicado em maio de 2011, vol.30 (5), p. 396-401 (acesso pago).

Autores: Maria Cleonice A. Justino, Alexandre C. Linhares, Tatiana M. Lanzieri, Yllen Miranda, Joana D'Arc P. Mascarenhas, Erika Abreu, Sylvia F.S. Guerra, Alessilva S.L. Oliveira, Veronilce B. da Silva, Nervo Sanchez, Nadia Meyer, Fakrudeen Shafi, Eduardo Ortega-Barria, Montse Soriano-Gabarro, e Romulo E. Colindres.

O artigo demonstra a efetividade da vacina oral contra rotavírus humano (VORH) no período do estudo caso-controle em Belém, Pará, no período de maio de 2008 a abril de 2009, correspondendo ao objetivo geral da pesquisa (etapa caso-controle) e aos objetivos específicos sob os números um, dois e três.

6.2 ARTIGO II

Título: *Distribution of rotavirus genotypes in Belém, Northern Brazil, over a three year period post-national vaccine introduction*

Periódico: *The Pediatric Infectious Disease Journal*; no prelo.

Autores: Sylvia F.S. Guerra, Alexandre C. Linhares, Joana D'Arc P. Mascarenhas, Alessilva Oliveira, Maria Cleonice A. Justino, Patrícia Brasil, Suely Tuboi, Luana S. Soares, Elza Caroline Müller, Eduardo Ortega e Romulo Colindres.

O artigo em fase de submissão demonstra a circulação de genótipos circulantes de rotavírus que ocasionaram gastroenterite grave durante o período do estudo (2008 a 2011) em Belém, Pará, correspondendo ao objetivo específico sob o número quatro.

6.3 ARTIGO III

Título: *Rotavirus vaccination status and clinical severity among children hospitalised for acute gastroenteritis in Belém, Brazil*

Periódico pretendido: *The Pediatric Infectious Disease Journal*.

Autores: Maria Cleonice A. Justino, Patrícia Brasil, Suely Tuboi, Yllen Miranda, Erika Abreu, Veronilce B da Silva e Alexandre C. Linhares

Artigo em fase final de redação, sob revisão dos autores, demonstra resultados obtidos na análise por sintoma de gastroenterite causada por rotavírus e sua correlação com o esquema de imunização recebido (completo, incompleto e não administrado) correspondendo aos objetivos específicos do estudo sob números cinco e seis.

6.1 ARTIGO I

Artigo publicado no periódico “*The Pediatric Infectious Disease Journal*”, 2011, vol.30 (5), p. 396-401 (acesso pago).

Effectiveness of the Monovalent G1P[8] Human Rotavirus Vaccine Against Hospitalization for Severe G2P[4] Rotavirus Gastroenteritis in Belém, Brazil

Maria Cleonice A. Justino, MD, MSc, Alexandre C. Linhares, MD, PhD,* Tatiana M. Lanzieri, MD, MSc,† Yllen Miranda, MD,* Joana D’Arc P. Mascarenhas, B Pharm, PhD,* Erika Abreu, MD,* Sylvia F. S. Guerra, B Pharm, MSc,* Alessilva S. L. Oliveira, B Pharm, MSc* Veronilce B. da Silva, RN,* Nervo Sanchez, MD,† Nadia Meyer, MD,‡ Fakrudeen Shafi, MSc,§ Eduardo Ortega-Barria, MD,† Montse Soriano-Gabarró, MD, MSc,‡# and Romulo E. Colindres, MD MPH†*

Affiliations: *Instituto Evandro Chagas, Secretaria de Vigilância em Saúde, Belém, Brazil; †GlaxoSmithKline, Rio de Janeiro, Brazil; ‡GlaxoSmithKline Biologicals, Wavre, Belgium; and §GlaxoSmithKline Biologicals, Bangalore, India

#Current affiliation: Bayer Shering Pharma, Berlin, Germany.

Running title: Human rotavirus vaccine effectiveness

Address for correspondence: Professor Alexandre C. Linhares, Instituto Evandro Chagas, Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministry of Health, Belém, Pará, Brazil (alexandrelinhares@iec.pa.gov.br)

Potential conflicts of interest: All investigators at study clinical sites were funded through their institutions to do the study protocol. MCAJ and ACL have received travel grants from GlaxoSmithKline Biologicals. TML, NS, NM, FS, EOB and REC are employees of GlaxoSmithKline Biologicals. MSG was an employee of GlaxoSmithKline Biologicals at the time of this study.

Presented in part: 28th Annual Meeting of the European Society for Pediatric Infectious Diseases, Nice, France, 4–8 May, 2010 (abstract 463).

Financial support: This study was funded by GlaxoSmithKline Biologicals. The study sponsor designed the study in collaboration with investigators, and coordinated data gathering, analysis and interpretation, and writing of the report. Authors had full access to all study data and final responsibility for the decision to submit for publication.

ABSTRACT

Background: Brazil initiated universal immunization of infants with the G1P[8] human rotavirus (RV) vaccine in March 2006. This study evaluated vaccine effectiveness (VE) against severe rotavirus gastroenteritis (RVGE) hospitalizations.

Methods: Matched case-control study conducted at four hospitals in Belém from May 2008 to May 2009. Cases were children hospitalized with RVGE age-eligible to have received two doses of the human RV vaccine (≥ 12 weeks of age and born after 6 March 2006). For each case, one neighborhood and one hospital control without gastroenteritis was selected, matching by birth date (± 8 and ± 6 weeks, respectively). Matched odds ratio (OR) of two-dose RV vaccination in cases versus controls was used to estimate VE ($1 - \text{OR} \times 100\%$).

Results: Of 538 RVGE cases, 507 hospital controls and 346 neighborhood controls included, 54%, 61% and 74% had received both RV vaccine doses. VE against RVGE hospitalization was 75.8% (95% CI: 58.1–86.0) using neighborhood controls and 40.0% (95% CI: 14.2–58.1) using hospital controls. VE in children aged 3–11 months and ≥ 12 months was 95.7% (95% CI: 67.8–99.4) and 65.1% (95% CI: 37.2–80.6) using neighborhood controls, and 55.6% (95% CI: 12.3–77.5) and 32.1% (95% CI: -3.7–55.5) using hospital controls. G2P[4] accounted for 82.0% of RVGE hospitalizations. G2P[4]-specific VE was 75.4% (95% CI: 56.7–86.0) using neighborhood controls and 38.9% (95% CI: 11.1–58.0) using hospital controls.

Conclusions: Although fully heterotypic G2P[4] was the predominant RV strain, good vaccine effectiveness was demonstrated. VE was highest in children aged 3–11 months. However, protection in children aged ≥ 12 months, important for optimal public health impact, was significantly sustained based on estimates obtained using neighborhood controls.

Key Words: gastroenteritis, rotavirus, hospitalizations, human rotavirus vaccine, Brazil

INTRODUCTION

Rotavirus (RV) is the most common cause of acute gastroenteritis (GE) requiring medical attention or hospitalization in young children worldwide, accounting for approximately 2.4 million hospitalizations and more than half a million deaths annually among children aged less than 5 years.¹⁻⁴ The availability of safe and effective vaccines against RV offers the potential to reduce the global burden of RVGE.^{2,5,6} The World Health Organization (WHO) recommends inclusion of RV vaccination of infants into all national immunization programmes.⁵ Two oral RV vaccines are now available in many countries — a 2-dose human G1P[8] RV vaccine (*Rotarix*[™]; GlaxoSmithKline Biologicals, Rixensart, Belgium) and a 3-dose live bovine-human reassortant pentavalent vaccine (*Rotateq*[™]; Merck Vaccines, Whitehouse Station, New Jersey, USA).⁷ Both vaccines have been shown to be safe and highly effective for the prevention of RVGE in large-scale clinical trials⁸⁻¹⁴ and post-licensure studies.^{7,15-17}

The human RV vaccine is currently licensed in 13 Latin American countries. Brazil was the first country in the region to incorporate this vaccine into the national Expanded Program on Immunization, with RV vaccination available free of charge at public primary healthcare centers throughout the country since March 2006. Prior to RV vaccine introduction, RV accounted for an annual 3.5 million episodes of GE, 650,000 visits to outpatient healthcare facilities, 92,000 hospitalizations and 850 deaths among Brazilian children aged less than 5 years.¹⁸ RV accounted for approximately 43% of all GE hospitalizations in this age group¹⁹ and 46% of GE hospitalizations in children aged less than 3 years.²⁰

With RV vaccines increasingly being introduced into childhood immunization programs, monitoring vaccine effectiveness under normal operational conditions is a high priority.^{21,22} In parallel, continuous surveillance of circulating RV strains is warranted during the post-introduction period to evaluate any potential impact of RV vaccination on genotype diversity.²³ We assessed the effectiveness of the human RV vaccine for the prevention of severe RVGE hospitalizations in children age-eligible to have received both vaccine doses in Belém, Brazil. In order to mimic the real-life scenario, the effectiveness of partial vaccination was also assessed.

METHODS

Study Setting and Design

This was a hospital-based, age-matched case-control study in Belém, a large city in Northeastern Brazil with a population of 1,437,604 and an annual birth cohort of 24,054.^{24,25} Active surveillance for RVGE was conducted at 4 large urban pediatric clinics/hospitals with a total of 294 pediatric beds, accounting for approximately 80% of all pediatric admissions for severe GE in Belém. RV strain surveillance was initiated in parallel with the case-control study and is currently ongoing.

Study design was based on the WHO generic protocol for monitoring the impact of RV vaccination on GE disease burden.²¹ The protocol was reviewed and approved by the independent ethics committee of the investigational center at Instituto Evandro Chagas, Secretaria de Vigilância em Saúde, Brazilian Ministry of Health. Written informed consent was obtained from the parents/guardians of all participating children prior to study entry.

Case Definition and Enrolment

Cases were children at least 12 weeks of age born after 6 March 2006 hospitalized with laboratory-confirmed severe RVGE, defined as diarrhea (three or more looser than normal stools within 24 hours), with or without vomiting, of less than 14 days duration requiring at least an overnight stay and intravenous rehydration therapy in one of the participating centers during the study period. As part of routine clinical practice, stool samples were collected within 48 hours of admission and tested for the presence of RV by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) at the Ministry of Health's National Rotavirus Reference Laboratory, Instituto

Evandro Chagas. Only children with ELISA-confirmed RVGE were eligible for inclusion as a case. Children with onset of severe RVGE more than 48 hours after hospital admission (nosocomial infections) were excluded. All ELISA-positive stool samples were tested by polymerase chain reaction (PCR) at Instituto Evandro Chagas for determination of RV G and P type.

Control Definition and Enrolment

For each case, we planned to enroll one hospital and one neighborhood control. Hospital controls were children hospitalized for any reason except GE or another vaccine-preventable disease identified through review of the hospital admission log book and matched progressively to cases by date of birth (from ± 2 weeks, up to a maximum of ± 6 weeks). Neighborhood controls were children without any signs or symptoms of GE who had resided in the same neighborhood as the case for at least 3 months. Neighborhood controls were selected by interviewing neighbors to the right and left of the case home in a sequential manner until a child born within ± 8 weeks of the case was enrolled. This wider age range for neighborhood controls was used because of logistical difficulties in order to facilitate the enrolment of subjects.

Data Collection

After informed consent had been obtained, parents/guardians of all cases/controls were interviewed by a pediatrician or nurse to obtain information on demographics, medical history, GE symptoms and treatment prior to hospitalization (cases only), and diagnosis at hospital admission and discharge (cases and hospital controls). Study staff also reviewed medical records and recorded appropriate information for cases and hospital controls. For both cases and controls, vaccination history was confirmed by vaccination card review during the interview with the parent/guardian.

Statistical Analysis

All statistical analyses were performed using SAS statistical software (version 9.1; SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA). Considering RV vaccine coverage of 69.1% for the first dose and 52.1% for the full 2-dose course among controls (Pará State Secretary of Public Health, September 2007), through simulation (2000 runs) and conditional logistic regression we estimated that a total of 230 cases and 230 controls would provide a power of 97% to demonstrate that vaccine effectiveness (VE) is higher than 50%, with an alpha level of 5%, when the true VE is 80%.

For calculation of VE of the full 2-dose course of human RV vaccine, the analysis included only pairs for which the case and the controls had received either 0 or 2 vaccine doses and who met all protocol-defined criteria. Cases were required to have received the first dose of human RV vaccine at least 14 days before the onset of severe GE to be included in this analysis. VE (%) was estimated as 1 minus the matched odds ratio of vaccination multiplied by 100 for each control group. Conditional logistic regression was used to estimate the matched odds ratio (hazard ratio using SAS code of PROC PHREG), with 95% Wald confidence limits,²⁶ and was repeated to include potential confounders, for which a backward elimination strategy was used to retain variables with $P \leq 0.20$.^{16,27} VE of the full 2-dose course of human RV vaccine was estimated according to age (3–11 months and ≥ 12 months), severity of RVGE hospitalizations determined using the Vesikari scale,²⁸ and RV genotype. VE was also estimated in children who had received at least 1 vaccine dose. Finally, in order to include some of the subjects with missing/unknown vaccination history, in addition to the actual VE, VE was also calculated using a sensitivity analysis assuming cases and controls with missing/unknown vaccination history were vaccinated and unvaccinated, respectively, for the worst case scenario (sensitivity -), or the opposite for the best case scenario (sensitivity +).

The proportion of hospital admissions for severe GE and the proportion of severe GE hospitalizations attributable to RV were calculated with exact 95% CI. Demographic characteristics, age distribution, disease seasonality, severity and distribution of RV G and P types were also tabulated. Due to non-normality, sparse or unbalanced data, demographic characteristics were compared between cases and each set of controls using the Fisher exact test for categorical variables and the Mann-Whitney-Wilcoxon two sample test for continuous variables. Two-sided *P* values of <0.05 were considered statistically significant.

RESULTS

Study Population

Between May 14, 2008 and May 28, 2009, 10828 age-eligible children were hospitalized at the participating centers, 4692 (43.3%) of whom were hospitalized due to severe GE. Of these, 80.2% (3763/4692) provided stool samples for testing, 24.1% of which were positive for RV by ELISA (906/3763). The proportion of ELISA-confirmed severe RVGE hospitalizations varied by age and was highest in children aged 12–23 months, with 53.2% (482/906) of RVGE hospitalizations occurring in this age group. The proportion of severe RVGE hospitalizations varied over time, peaking during July and August 2008 and April 2009 (Fig. 1).

A total of 538 RV-positive children were enrolled as cases (59.4% of those testing positive for RV in the screened population), 522 of whom had a matched hospital and/or neighborhood control (97.0%). Differences between the screened and enrolled RV-positive subjects, with respect to age distribution or area of residence that could impact the results, were not identified. Overall, 368 RV-positive children were not included as a case in the final according-to-protocol (ATP) analysis. Because of logistical reasons (e.g. child was discharged from the hospital and moved away from the study area, address could not be found, etc.), it was not possible to obtain written informed consent from parents/guardians for 317 subjects. In the additional 51 subjects for whom informed consent had been obtained, reasons for exclusion from the ATP analysis were stool sample collected more than 48 hours after admission (15 subjects), nosocomial diarrhea (15 subjects), diarrhea did not meet the protocol definition (13 subjects), previous enrolment (3 subjects), persistent diarrhea (2 subjects), doubtful history of diarrhea (1 subject), outside the age group (1 subject), and birth date unknown (1 subject). It was not possible to enroll both a matched hospital and a neighborhood control for all cases. Among children screened as hospital controls, 516/885 (58.3%) were enrolled and 507 met the criteria for inclusion in the case-control analysis. There was an uneven temporal distribution of cases and hospital controls (>90% of the hospital controls were acute respiratory infections), leading to a significant difference in the time period of their recruitment into the study (month, year). While most of the cases occurred during July–August 2008 (150/538; 28%), respiratory illnesses (hospital controls) peaked in October–November 2008 (145/507; 28.6%). In the former period, for instance, there were too few hospitalizations for acute respiratory infections to match a large number of RVGE hospitalizations.

The absolute median (range) difference between date of birth of cases and hospital controls was 1 (0–6) week. The median duration of hospitalization for both cases and hospital controls was 5 days. Among children screened as neighborhood controls, 348/387 (89.9%) were enrolled and 346 met the criteria for inclusion in the case-control analysis. The absolute median (range) difference between date of birth of cases and neighborhood was 3 (0–8) weeks.

Demographic characteristics are shown in Table 1. Median age of study participants was 17 months, 52.6% were male, all were American Hispanic or Latino and 90.4% lived in Belém. Of note, the proportion of hospital controls that lived in Belém was lower than for neighborhood controls (87.6% and 95.7%, respectively).

RV Vaccination History

In all, 68.0% of cases, 76.3% of hospital controls and 85.3% of neighborhood controls had received at least 1 dose of the human RV vaccine, with 53.7% of cases, 60.7% of hospital controls and 74.0% of neighborhood controls having completed the full 2-dose course (Table 2). The percentage of vaccinated subjects that received the first vaccine dose between 8 and 12 weeks of age was 87.2%, 80.4% and 86.8%, in the three groups, respectively. The respective proportions of vaccinated subjects who had completed the full 2-dose course by 24 weeks of age were 77.3%, 76.2% and 85.4%.

Most subjects had received other recommended vaccinations. However, for most vaccines, coverage rates were 5–6% lower in hospital controls than in neighborhood controls (Table 2).

Vaccine Effectiveness

VE of 2 doses of the human RV vaccine for the prevention of severe RVGE hospitalization was 75.8% (95% CI: 58.1–86.0) using neighborhood controls and 40.0% (95% CI: 14.2–58.1) using hospital controls (Table 3). VE in cases and hospital controls that lived in the same district was 52.9% (95% CI: -9.1–79.7). VE was higher in children aged 3–11 months than in those aged ≥ 12 months (95.7% [95% CI: 67.8–99.4] versus 65.1% [95% CI: 37.2–80.6] using neighborhood controls and 55.6% [95% CI: 12.3–77.5] versus 32.1% [95% CI: -3.7–55.5] using hospital controls in the two age groups, respectively).

During hospitalization, 58.4% of RVGE cases were rated as mild/moderate (Vesikari score 1–10), 41.6% as severe (Vesikari score ≥ 11) and 9.7% as very severe (Vesikari score ≥ 15). Using neighborhood controls, VE of 2 doses of the human RV vaccine was 72.7% (95% CI: 43.0–87.0), 78.8% (95% CI: 52.1–90.6) and 90.0% (95% CI: 21.9–98.7) for the prevention of mild/moderate (Vesikari score 1–10), severe (Vesikari score ≥ 11) and very severe (Vesikari score ≥ 15) RVGE respectively. Respective VE estimates using hospital controls were 25.6% (95% CI: -20.2–54.0), 53.7% (95% CI: 20.2–73.1) and 28.6% (95% CI: -125.1–77.3).

Strain characterization was conducted on all enrolled 538 RV-positive cases. G2P[4] was the most common RV type, accounting for 82.0% (441/538) of cases. Of the 97 (18%) non-G2P[4] strains identified, 1 was G1P[6] (0.2%), 11 were G1P[8] (2.0%), 16 were G2P[6] (3.0%), 2 were G9P[4] (0.4%), 1 was G9P[6] (0.2%), 2 were G9P[8] (0.4%), 11 were G12P[6] (2.0%), 48 were mixed types (8.9%) and 5 were untypeable (0.9%).

VE of 2 doses of the human RV vaccine for the prevention of severe G2P[4] RVGE was 75.4% (95% CI: 56.7–86.0) using neighborhood controls and 38.9% (95% CI: 11.1–58.0) using hospital controls. For RVGE caused by pooled non-G2P[4] types, VE of 2 doses of the human RV vaccine was 70.0% (95% CI: -9.0–91.7) using neighborhood controls and reached 50% (95% CI: -33.2–81.2) using hospital controls.

In children who had received at least 1 vaccine dose, VE using neighborhood controls was 62.3% (95% CI: 42.3–75.4) overall, 88.9% (95% CI: 63.4–96.6) in children aged 3–11 months, and 48.0% (95% CI: 16.5–67.6) in those aged ≥ 12 months. Corresponding VE using hospital controls was 44.2% (95% CI: 23.1–59.6) overall and 60.5% (95% CI: 28.2–78.3) and 34.9% (95% CI: 4.3–55.6) in the two age groups, respectively.

After controlling for potential confounders (or risk factors) in the conditional logistic regression model (Supplemental Digital Content, Tables 1 and 2), VE was 73.6% (95% CI: 53.9–84.9) and 43.3% (95% CI: 8.4–64.8) using neighborhood and hospital controls, respectively. Age ≥ 1 year was significantly associated with RVGE using neighborhood controls. For hospital controls, time period of recruitment into the study, the presence of underlying medical conditions and diet including breastfeeding also had a significant impact on VE.

Results of the sensitivity analysis for the primary objective ranged from 71.2–77.8% using neighborhood controls and from 21.3–52.0% using hospital controls (Table 3).

DISCUSSION

This study demonstrated the effectiveness of two doses of the human RV vaccine for the prevention of severe RVGE hospitalizations, predominantly due to the G2P[4] strain, in Belém, Brazil, one of the settings where the pivotal Latin American Phase III trial of this vaccine was conducted.^{8,11} The effectiveness of both 2 doses and at least 1 dose of human RV vaccine was comparable to the findings of previous clinical trials in the region.^{11,29}

The effectiveness of RV vaccines against the fully heterotypic G2[P4] strain is currently of particular interest, since this strain seems to be showing natural re-emergence in Latin America and many other parts of the world.^{19,30–35} The human RV vaccine has been shown to provide broad protection against circulating G1 and non-G1 strains in randomized controlled clinical trials, with G2P[4]-specific efficacy ranging from 45–86%.^{8,10–12} A meta-analysis of results from 6 randomized controlled clinical trials indicated a VE of 81% against G2P[4] RVGE of any severity and of 71% against severe G2P[4] RVGE.³⁶ We found the human RV vaccine to provide a high level of protection against hospitalization for G2P[4] RVGE, in line with the results of another recent study in Recife, Brazil, which had an unmatched case-control design and demonstrated VE of 77% against severe G2P[4] RVGE requiring hospital admission or emergency department treatment in children aged 6–11 months.¹⁷

Duration of protection is another important factor influencing the potential public health impact of RV vaccines. VE of 83–85% against hospitalization for severe GE caused by the fully heterotypic G2P[4] type was seen in children aged 6–11 months and non-significant results in children ≥ 12 months in the Recife study.¹⁷ We also observed highest VE in children aged 3–11 months (96%), with lower but still significant protection in children aged ≥ 12 months (65%) using neighborhood controls. Vaccine efficacy was also found to be slightly lower during the second year of follow-up in the Phase III study in Latin America (79% versus 83% during the first year).

The proportion of severe GE hospitalizations attributable to RV was low in this study compared to that reported in Belém and other regions in Brazil prior to RV vaccine introduction (43–46%).^{19,20} Similarly, the proportion of RV-positive cases among children with diarrhea accessing emergency services decreased from 24% in 2006 to 7% in 2008 in Aracaju, Brazil, with greatest reductions seen in the youngest age groups.³⁷ A marked decline in hospitalizations for all-cause gastroenteritis among children younger than 1 year following the introduction of RV vaccination in Brazil has also recently been reported.³⁸ While earlier studies in Brazil and Latin America found approximately 50% of RV cases to occur in children aged < 12 months and 80% in those aged < 24 months,²⁰ most RVGE occurred in children 12–23 months of age in this study, followed by infants aged 3–11 months and children aged > 24 months. It is possible that the age distribution and severity of RVGE may change after vaccine introduction, with less severe cases occurring among older children. However, protection against RVGE during the first two years of life is particularly important, as this is the time when RV infections are most severe.

Although we used an age-matched case-control design and obtained a large sample size, the marked differences in VE using the two different control groups are striking. Case-control studies are an effective method of monitoring VE in real-life conditions, particularly during the early phases of vaccine introduction.²¹ However, choice of control group can have a significant impact on VE estimates.^{21,39–41} For RV infection, neighborhood controls provide the advantage of controlling for key potential confounding factors which could impact on risk of developing severe RVGE, particularly sociodemographic status and general access to vaccination and medical care. In contrast, greater variability in such factors may occur among hospitalized controls. Hospitalization and emergency department visits are recognized to be potential

markers of under-vaccination, even in children with access to healthcare.⁴² In Belém, vaccination is performed at primary healthcare centers with well-defined catchment areas and not in hospitals, and vaccination coverage varies greatly geographically.⁴³ VE increased when we attempted to augment comparability of hospital controls to neighborhood controls by restricting analysis to cases and hospitals controls that lived in the same districts in Belém. In this study, a higher proportion of hospital controls than cases and neighborhood controls resided outside of the Belém area. Furthermore, coverage rates for most routine childhood vaccines were lower in hospital controls than neighborhood controls. In addition, a higher proportion of hospital controls had missing or unknown RV vaccination status which may explain the greater variability in the sensitivity analysis using this group. One possible limitation of our study in this context was that hospital controls were not screened for RV infection. According to routine clinical practice in each participating hospital and the generic WHO protocol followed,²¹ stool samples were only tested for the presence of RV by ELISA if GE was present at admission.

In summary, results of this study show a considerable reduction in the proportion of severe GE hospitalizations attributable to RV in children aged less than 3 years in Belém, Brazil following introduction of the human RV vaccine. Good vaccine effectiveness was demonstrated versus fully heterotypic G2P[4], which was the predominant RV strain throughout the study period. Vaccine effectiveness was highest in children aged 3–11 months. However, our results also suggest that the vaccine affords protection in older children aged ≥ 12 months, based on estimates obtained using neighborhood controls. Ongoing surveillance studies should further demonstrate the public health benefits afforded by this RV vaccine in community settings.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr Helena Progênio, all the staff at the Clínica Santa Terezinha, Clínica Pio XII, Hospital Serzedelo Correa (formerly, Clínica Pediátrica do Pará) and Policlínica Infantil de Nazaré in Belém who were involved in the conduct of this study, and all the participating children and their parents/guardians. We also thank the clinical operations team at GlaxoSmithKline Biologicals, Brazil lead by Amanda Novaes; Kusuma Gopala, Pryia Rajagopal and other members of the CDOC-B team at GlaxoSmithKline Biologicals who provided statistical input to the protocol, scientific writing support and assisted with data management; Thomas Verstraeten (GlaxoSmithKline Biologicals) for critical review of the manuscript; Jennifer Coward (Independent Medical Writer, Bollington, UK) for medical writing assistance and Jessica Mattos for publication coordination on behalf of GlaxoSmithKline Biologicals.

Rotarix is a registered trademark of the GlaxoSmithKline group of companies.

Rotateq is a registered trademark of Merck & Co. Inc.

REFERENCES

1. Parashar UD, Gibson CJ, Bresse JS, Glass RI. Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerg Infect Dis.* 2006;12:304–330.
2. World Health Organization. Rotavirus vaccines. WHO position paper. *Wkly Epidemiol Rec.* 2007;82:285–396.
3. Rotavirus Surveillance—Worldwide, 2001–2008. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2008;57:1255–1257.
4. Parashar UD, Burton A, Lanata C, et al. Global mortality associated with rotavirus disease among children in 2004. *J Infect Dis.* 2009;200:S9–15.

5. Meeting of the immunization Strategic Advisory Group of Experts, April 2009 – conclusions and recommendations. *Wkly Epidemiol Rec.* 2009;84:220–236.
6. Danchin MH, Bines JE. Defeating rotavirus? The global recommendation for rotavirus vaccination. *New Engl J Med.* 2009;61:919–921.
7. Grimwood K, Lambert SB. Rotavirus vaccines. Opportunities and challenges. *Hum Vaccin.* 2009;5:57–69.
8. Ruiz-Palacios GM, Pérez-Schael I, Velázquez FR, et al. Safety and efficacy of an attenuated vaccine against severe rotavirus gastroenteritis. *N Engl J Med.* 2006;354:11–22.
9. Vesikari T, Matson DO, Dennehy P, et al. Safety and efficacy of a pentavalent human-bovine (WC3) reassortant rotavirus vaccine. *N Engl J Med.* 2006;354:23–33.
10. Vesikari T, Karvonen A, Prymula R, et al. Efficacy of human rotavirus vaccine against rotavirus gastroenteritis during the first 2 years of life in European infants: randomised, double-blind controlled study. *Lancet.* 2007;370:1757–1763.
11. Linhares AC, Velázquez FR, Pérez-Schael I, et al. Efficacy and safety of an oral live attenuated human rotavirus vaccine against rotavirus gastroenteritis during the first 2 years of life in Latin American infants: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase III study. *Lancet.* 2008;371:1181–1189.
12. Phua KB, Lim FS, Lau YL, et al. Safety and efficacy of human rotavirus vaccine during the first 2 years of life in Asian infants: randomised, double-blind, controlled study. *Vaccine.* 2009;27:5936–5941.
13. Vesikari T, Itzler R, Karvonen A, et al. RotaTeq, a pentavalent rotavirus vaccine: efficacy and safety among infants in Europe. *Vaccine.* 2009;28:345–351.
14. Madhi SA, Cunliffe NA, Steele D, et al. Effect of human rotavirus vaccine on severe diarrhea in African infants. *N Engl J Med.* 2010;362:289–298.
15. O’Ryan M, Linhares AC. Update on *Rotarix*TM: an oral human rotavirus vaccine. *Expert Rev Vaccines.* 2009;8:1627–1641.
16. Patel M, Pedreira C, De Oliveira LH, et al. Association between pentavalent rotavirus vaccine and severe rotavirus diarrhea among children in Nicaragua. *JAMA.* 2009;301:2243–2251.
17. Correia JB, Patel MM, Nakagomi O, et al. Effectiveness of monovalent rotavirus vaccine (*Rotarix*TM) against severe diarrhea caused by serotypically unrelated G2P[4] strains in Brazil. *J Infect Dis.* 2010;201:363–369.
18. Sartori AM, Valentim J, de Soárez PC, Novaes HM. Rotavirus morbidity and mortality in children in Brazil. *Rev Panam Salud Publica.* 2008;23:92–100.
19. Munford V, Gilio AE, de Souza EC, et al. Rotavirus gastroenteritis in children in 4 regions in Brazil: a hospital-based surveillance study. *J Infect Dis.* 2009;200:S106–113.
20. Abate H, Linhares AC, Venegas G, et al. Results of a hospital-based study on rotavirus gastroenteritis in Latin American children. In: 24th International Congress of Pediatrics (ICP), 15–20 August 2004; Cancun, Mexico. Abstract no. 656.
21. World Health Organization. Generic protocol for monitoring impact of rotavirus vaccination on gastroenteritis disease burden and viral strains. World Health Organization,

Geneva; December 2008. Available at: http://whqlibdoc.who.int/hq/2008/WHO_IVB_08.16_eng.pdf. Accessed October 2010.

22. Patel MM, Parashar UD. Assessing the effectiveness and public health impact of rotavirus vaccines after introduction in immunization programs. *J Infect Dis*. 2009;200:S291–299.
23. Matthijnssens J, Bilcke J, Ciarlet M, et al. Rotavirus disease and vaccination: impact on genotype diversity. *Future Microbiol*. 2009;4:1303–1316.
24. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - População Residente. Available at: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/defthtm.exe?ibge/cnv/poppa.def>. Accessed October 2010.
25. Sistema de Informações de Nascidos Vivos. Available at: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinascp/cnv/nvpa.def>. Accessed October 2010.
26. Tarone RE, Gart JJ, Hauck WW. On the asymptotic inefficiency of certain noniterative estimators of a common relative risk or odds ratio. *Biometrika*. 1983;70:519–522.
27. Niccolai LM, Ogden LG, Muehlenbein CE, Dziura JD, Vázquez M, Shapiro ED. Methodological issues in design and analysis of a matched case-control study of a vaccine's effectiveness. *J Clin Epidemiol*. 2007;60:1127–1131.
28. Ruuska T, Vesikari T. Rotavirus disease in Finnish children: use of numerical scores for clinical severity of diarrhoeal episodes. *Scand J Infect Dis*. 1990;22:259–267.
29. López P, Linhares A, Pérez-Schael I, et al. Early protection against severe rotavirus gastroenteritis – RIX4414 experience in Latin America. In: 24th Annual Meeting of the European Society for Paediatric Infectious Diseases (ESPID), 3–5 May 2006; Basel, Switzerland. Abstract no. 462.
30. Kirkwood CD, Cannan D, Boniface K, Bishop RF, Barnes GL; Australian Rotavirus Surveillance Group. Australian Rotavirus Surveillance Program annual report, 2007/08. *Commun Dis Intell*. 2008;32:425–429.
31. Leite JP, Carvalho-Costa FA, Linhares AC. Group A rotavirus genotypes and the ongoing Brazilian experience: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2008;103:745–753.
32. Antunes H, Afonso A, Iturriza M, et al. G2P[4] the most prevalent rotavirus genotype in 2007 winter season in an European non-vaccinated population. *J Clin Virol*. 2009;45:76–78.
33. Carvalho-Costa FA, Araújo IT, Santos de Assis RM, et al. Rotavirus genotype distribution after vaccine introduction, Rio de Janeiro, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2009;15:95–97.
34. Dey SK, Hayakawa Y, Rahman M, et al. G2 strain of rotavirus among infants and children, Bangladesh. *Emerg Infect Dis*. 2009;15:91–94.
35. Hasing ME, Trueba G, Baquero MI, et al. Rapid changes in rotaviral genotypes in Ecuador. *J Med Virol*. 2009;81:2109–2113.
36. De Vos B, Han HH, Bouckennooghe A, et al. Live attenuated human rotavirus vaccine, RIX4414, provides clinical protection in infants against rotavirus strains with and without shared G and P genotypes: integrated analysis of randomized controlled trials. *Pediatr Infect Dis J*. 2009;28:261–266.

37. Gurgel RG, Bohland AK, Vieira SC, et al. Incidence of rotavirus and all-cause diarrhea in northeast Brazil following the introduction of a national vaccination program. *Gastroenterology*. 2009;137:1970–1975.
38. Lanzieri TM, Costa I, Shafi FA, et al. Trends in hospitalizations from all-cause gastroenteritis in children younger than 5 years of age in Brazil before and after human rotavirus vaccine introduction, 1998-2007. *Pediatr Infect Dis J*. 2010;29:673–675.
39. Smith PG. Epidemiological methods to evaluate vaccine efficacy. *Br Med Bull*. 1988;44:679–690.
40. Rodrigues LC, Smith PG. Use of the case-control approach in vaccine evaluation: efficacy and adverse effects. *Epidemiol Rev*. 1999;21:56–72.
41. Dantas OM, Ximenes RA, de Albuquerque M de F, et al. Selection bias: neighborhood controls and controls selected from those presenting to a Health Unit in a case control study of efficacy of BCG revaccination. *BMC Med Res Methodol*. 2007;7:11.
42. Rodewald LE, Szilagyi PG, Humiston SG, et al. Is an emergency department visit a marker for undervaccination and missed vaccination opportunities among children who have access to primary care? *Pediatrics*. 1993;91:605–611.
43. DATASUS. Imunizações – Cobertura. Available at: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?zni/CNV/CPNIPA.def>. Accessed October 2010.

TABLE 1. Demographic Characteristics of Study participants in Belém, Brazil (May 14, 2008–May 28, 2009)

Characteristic	Cases	Hospital controls	<i>P</i> value	Neighborhood controls	<i>P</i> value	Total
	(N=538)	(N=507)		(N=346)		(N=1391)
Gender, %						
Male	50.7	52.9	0.500	54.9	0.240	52.6
Female	49.3	47.1		45.1		47.4
Age, months						
Median (range)	16 (3–36)	18 (3–36)	0.008	17 (3–36)	0.240	17 (3–36)
Age group, %						
3–5 months	2.6	2.4		1.4		2.2
6–11 months	22.9	19.3		19.1		20.6
12–23 months	53.9	53.6		57.5		54.7
≥24 months	20.6	24.7		22.0		22.4
Living in Belém at the time of the study, %						
Yes	89.8	87.6	0.280	95.7	0.001	90.4
No	10.2	12.4		4.3		9.6

P values were calculated using exact Fisher test for categorical variables and Mann-Whitney-Wilcoxon two sample test for continuous variable

TABLE 2. Vaccination History of Study Participants in Belém, Brazil (May 14, 2008–May 28, 2009)

Vaccine	Cases (N=538)		Hospital controls (N=507)		Neighborhood controls (N=346)	
	n	%	n	%	n	%
Human RV vaccine						
At least 1 dose	366	68.0	387	76.3	295	85.3
2 doses	289	53.7	308	60.7	256	74.0
Missing/unknown	25	4.6	38	7.5	7	2.0
Other routine vaccines ^a						
BCG	511	95.0	468	92.3	339	98.0
DTP/Hib	500	92.9	462	91.1	334	96.5
Hepatitis B	513	95.4	468	92.3	339	98.0
MMR	306	56.9	303	59.8	224	64.7
OPV	508	94.4	467	92.1	336	97.1
Yellow fever	375	69.7	365	72.0	268	77.5

N, number of subjects; n/%, number/percentage of subjects vaccinated

BCG, Bacillus Calmette-Guérin; DTP/Hib, Diphtheria-Tetanus-Pertussis/*Haemophilus influenzae* type b; MMR, Measles-Mumps-Rubella, OPV, Oral Polio Vaccine

^aAt least 1 dose

TABLE 3. Effectiveness of the Human RV Vaccine for the Prevention of Hospital Admissions for Severe RVGE in Belém, Brazil (May 14, 2008–May 28, 2009)

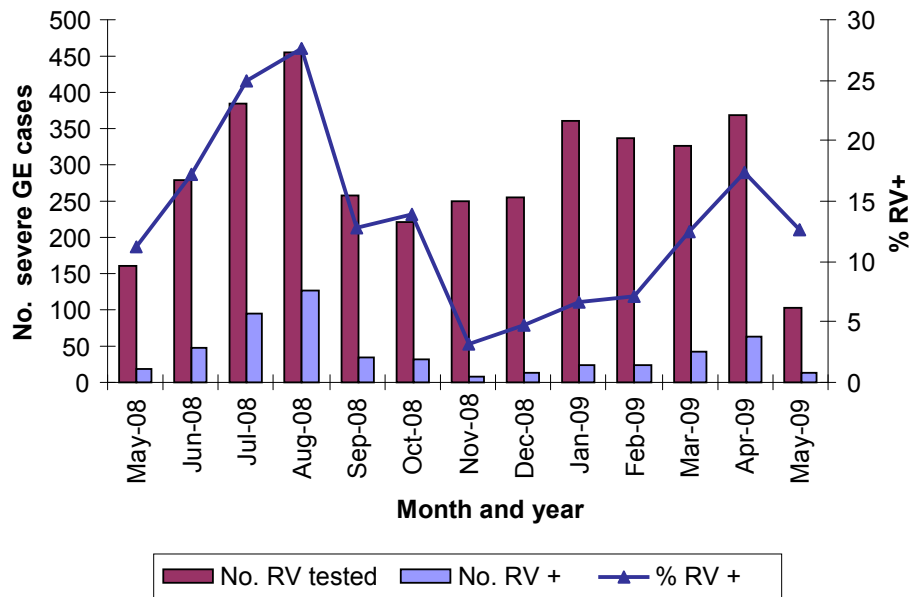
	Neighborhood controls					Hospital controls				
	Vaccine effectiveness			Sensitivity		Vaccine effectiveness			Sensitivity	
	N	%	95% CI	-	+	N	%	95% CI	-	+
Full 2-dose series										
Overall	249	75.8	58.1–86.0	71.2	77.8	312	40.0	14.2–58.1	21.3	52.0
3–11 months	64	95.7	67.8–99.4	95.7	95.8	77	55.6	12.3–77.5	48.1	58.6
≥12 months	185	65.1	37.2–80.6	58.1	68.8	235	32.1	-3.7–55.5	7.5	49.3
Full 2-dose series by RVGE severity (Vesikari score)										
Mild/moderate (1–10)	149	72.7	43.0–87.0	66.7	75.7	187	25.6	-20.2–54.0	2.6	42.0
Severe (≥11)	100	78.8	52.1–90.6	75.8	80.0	125	53.7	20.2–73.1	39.0	62.0
Very severe (≥15)	23	90.0	21.9–98.7	90.0	90.0	25	28.6	-125.1–77.3	0.0	37.5
Full 2-dose series against fully heterotypic G2P[4]	222	75.4	56.7–86.0	70.5	77.6	286	38.9	11.1–58.0	22.2	51.6
Full 2-dose series against pooled non-G2P[4] types	42	70.0	-9.0–91.7	70.0	70.0	46	50.0	-33.2–81.2	8.3	60.0
Full or partial series vaccination										
Overall	331	62.3	42.3–75.4	58.4	65.5	444	44.2	23.1–59.6	26.0	54.3
3–11 months	91	88.9	63.4–96.6	88.9	89.3	120	60.5	28.2–78.3	52.6	62.5
≥12 months	240	48.0	16.5–67.6	42.0	53.6	324	34.9	4.3–55.6	10.6	50.6

N, No. of matched pairs

Sensitivity -, cases and controls with other or unknown RV vaccination status are assumed respectively vaccinated and unvaccinated

Sensitivity +, cases and controls with other or unknown RV vaccination status are assumed respectively unvaccinated and vaccinated

FIGURE 1. Seasonal distribution of severe GE cases and the proportion of cases attributable to RVGE by month of year in Belém, Brazil (May 14, 2008–May 28, 2009)



6.2 ARTIGO II

Artigo em fase de submissão, periódico “*The Pediatrics Infectious Disease Journal*”.

Distribution of rotavirus genotypes in Belém, Northern Brazil, over a three year period post-national vaccine introduction

*Sylvia F.S. Guerra BPharm, MSc**, *Alexandre C. Linhares MD, PhD**, *Joana D’Arc P. Mascarenhas BPharm, PhD**, *Alessilva Oliveira BPharm, MSc**, *Maria Cleonice A. Justino MD, MSc*, *Patrícia Brasil MD, PhD**, *Suely Tuboi, Luana S. Soares BPharm, PhD**, *Elza Caroline Müller BPharm, MSc**, *Eduardo Ortega MD* †, *Rômulo Colindres MD, MPH* ‡.

Affiliations: *Instituto Evandro Chagas, Secretaria de Vigilância em Saúde, Belém, Brazil; † GlaxoSmithKline, Rio de Janeiro, Brazil; GlaxoSmithKline Vaccines, Wavre, Belgium

Running title: RV strain surveillance in Belém, Brazil

Address for correspondence: Professor Alexandre C. Linhares, Instituto Evandro Chagas, Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministry of Health, Belém, Pará, Brazil (alexandrelinhares@iec.pa.gov.br)

Potential conflicts of interest: All investigators at study clinical sites were funded through their institutions to do the study protocol. MCAJ and ACL have received travel grants from GlaxoSmithKline Biologicals. TML, NS, NM, FS, EOB and REC are employees of GlaxoSmithKline Biologicals. MSG was an employee of GlaxoSmithKline Biologicals at the time of this study.

Financial support: This study was funded by GlaxoSmithKline Biologicals. The study sponsor designed the study in collaboration with investigators, and coordinated data gathering, analysis and interpretation, and writing of the report. Authors had full access to all study data and final responsibility for the decision to submit for publication

Abstract

Background: The monovalent rotavirus (RV) vaccine, RIX4414 (*Rotarix*TM, GlaxoSmithKline Biologicals) was introduced into Brazil's Expanded Program on Immunization (EPI) in March 2006. Post-licensure studies reassured vaccine effectiveness and a substantial decline in gastroenteritis-related hospitalizations and deaths was documented. One year after the introduction of the vaccine, G2P[4] was found to be the predominant genotype, with an apparent extinction of non-G2 strains. This study therefore investigated the diversity of circulating RV strains for three years after the introduction of RIX4414.

Methods: Between May 2008 and May 2011, stool samples were collected from children aged ≥ 12 weeks who were hospitalised for severe RV gastroenteritis (RVGE), in Belém, Brazil. The proportion of severe RVGE was detected by enzyme linked immunosorbent assay and the G and P types were determined by reverse-transcription polymerase chain reaction assays.

Results: A total of 1726 of 10,030 severe GE hospitalizations (17.2%) were due to severe RVGE. The highest number of cases was observed during the month of August in 2008 (42.4%; 95% CI: 38.2-46.7, 227/535), 2009 (27.7%; 95% CI: 27.0-35.0, 378/282), and 2010 (33.0%; 95% CI: 27.9-38.5, 106/321). During the study, G2P[4] was detected in 57.2% of 1,076 RV-positive samples; it predominated during the first 20 months and ranged from 100% (66/66) in May 2008 to 29.4% (5/17) in June 2009. G1P[8] increased from May 2010 to May 2011, representing 36.6% (112/306) of the circulating strains.

Conclusion: G2P[4] was the predominant RV strain circulating during the first 20 months of the study, followed by G1P[8]. These findings probably reflect a natural fluctuation in RV strains over time, rather than a vaccine-induced selective pressure.

Word Count: 248/250

INTRODUCTION

Rotavirus (RV) is the leading cause of acute gastroenteritis (GE) among children younger than 5 years of age worldwide;¹ it accounts for approximately 40% of all cases of severe infant diarrhoea.² World Health Organization estimates in 2008 indicated that around 453,000 annual child deaths were due to RV.³ Recent estimates from Latin America and the Caribbean revealed that, in the absence of vaccination, RV causes up to 229,656 hospitalizations and 6302 deaths each year among children younger than 5 years of age.⁴ In Brazil, RV infections have been estimated to cause 850 annual deaths and 92,453 hospitalizations in this age group.⁵

Two live oral RV vaccines are currently available: a pentavalent, human-bovine reassortment vaccine with RV types G1, G2, G3, G4 and P[8] (*RotaTeq*TM, Merck & Co., Whitehouse Station, NJ) and a monovalent vaccine with an attenuated human G1P[8] RV strain, (RIX4414, [*Rotarix*TM, GlaxoSmithKline Biologicals, Rixensart, Belgium]).⁶ RV strains carrying either G1, G2, G3, G4, or G9 genotype-specificities, combined with P[4] or P[8] genotypes have been found to be the most prevalent causes of RV disease in humans.⁷⁻⁸ However, substantial temporal and geographical changes in strain prevalence can lead to the emergence of novel genotypes such as G12 carrying either P[8] or P[6]⁹⁻¹⁰ which theoretically could cause evasion of the immunity provided by the vaccine.¹¹

In March 2006, Brazil was one of the first countries to introduce RIX4414 into their Expanded Program on Immunization (EPI), which covers a birth cohort of around 2.9 million.¹² By September 2013, 47 countries had introduced RV vaccines into their EPI's, therefore increasing the need for conducting post-licensure studies. Although such studies have provided reassuring evidence for RIX4414 effectiveness, it is still debated if vaccine-induced selective pressure might impact circulating RV strains.¹³⁻¹⁶ The implementation of RIX4414 into the Brazilian EPI in 2006 coincided with a dramatic increase in circulating G2P[4], leading some investigators to suggest that a serotype replacement had occurred as a result of vaccine-induced selective pressure mechanisms.¹⁷⁻²⁴ However, as most of these studies covered a short surveillance period, the data obtained could reflect a natural fluctuation of G2P[4] over time, rather than a consequence of vaccination.

In this study we report the results from a long-term (2008–2011) hospital-based surveillance study of RV strains among children with severe RVGE in Belém, Northern Brazil.

METHODS

Study setting and design

This hospital-based study was conducted in Belém, Brazil between May 2008 and May 2011. Belém has a population of 2.08 million and an annual birth cohort of 24,054.²⁵ Strain surveillance was performed in two stages: May 2008–May 2009 in parallel with a case-control study to estimate the effectiveness of RIX4414 at four large urban hospitals²⁵; for an additional two years (May 2009–May 2011) at two of these hospitals, which received 50% of all GE-related paediatric hospitalizations in this area and covering a population that is still representative of Belém as a whole.

The protocol was approved by the Independent Ethics Committee of the Brazilian Ministry of Health's National Rotavirus Reference Laboratory, Instituto Evandro Chagas (IEC) and the Brazilian Ministry of Health. The study was carried out in accordance with the Declaration of Helsinki and Good Clinical Practice. Written informed consent was obtained from the parents/legal guardians of children before enrolment.

Case definition

Cases were defined as children at least 12 weeks of age, who had been born after March 6, 2006, and were hospitalised for laboratory-confirmed severe RVGE (≥ 3 liquid or semi-liquid motions over a 24-hour period for < 14 days, requiring ≥ 1 overnight hospital stay and intravenous rehydration therapy).

Assessments

Parents/guardians were interviewed to collect data on demographic and medical history. Stool samples were collected within 48 hours of admission and transported to the IEC, for RV testing using Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) (RIDASCREEN[®] Rotavirus; R-Biopharm, Darmstadt, Germany). The tests were performed according to the manufacturer's instructions and included positive and negative controls. ELISA-positive stool samples were subsequently subjected to reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR); to determine G and P genotypes. RT-PCR was performed using a 2-step amplification process as previously described.²⁶⁻³⁰ The second step was a nested PCR using G or P specific oligonucleotide primers targeted at G (G1, G2, G3, G4 and G9) and P (P[4], P[6], P[8] and P[9]) RV types.

Statistical analyses

Data analyses were performed using SAS version 9.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC). The proportion of GE hospitalizations attributable to RV was calculated with 95% confidence intervals [CI]. The distribution of RV G and P types was tabulated and compared with respect to age (3–5 months, 12–23 months and > 24 months), origin (common human strains, reassortments among common human strains, possible zoonotic strains and possible animal human hybrids) and temporally using Chi-square and Fischer exact tests. All tests were two-tailed and differences between variables were considered statistically significant at P -values ≤ 0.05 .

RESULTS

Of 10,030 severe GE hospitalizations between May 2008 and May 2011, RV was identified in 1,726 (17.2%) of cases. The final analysis included 1,078 cases (525 collected from May 2008 to April 2009, 258 from May 2009 to April 2010, and 295 from May 2010 to May 2011). The mean age of the subjects was 18.5 (± 9.4) months and 52.8% were male (Table 1). The highest percentage of hospitalizations for severe RVGE was seen in children ≥ 12 months of age (76.1%; 820/1078). Severe RVGE cases occurred throughout the study period, but peaked between July and September in all the period of study - three years (Fig. 1).

RV testing by RT-PCR was performed on 1076 samples and G and P types were successfully determined in 88.7% (954/1076) of cases. Single G and P strains were present in 88.6% (845/954) of samples and 11.4% (109/954) had mixed RV strains. G2P[4] was the most commonly observed RV strain (57.2% [614/1076]) followed by G1P[8] (14.9% [160/1076]). The most common mixed RV strains were G2P[4]+P[6] (2.9%; 31/1076) and G1+G2P[4] (2.2%; 24/1076). Strains that could not be fully G- and/or P-typed represented 11.3% (122/1076) of the total samples (Fig. 2).

RV strains were categorised according to their possible origin, as reported before by Iturriza-Gómara et al (2011)³¹: common human strains (74.1%; 797/1076); reassortments among common human strains (0.6%; 6/1076); potential zoonotic strains (0.2%; 2/1076) and possible human-animal hybrids (2.7%; 29/1076) (Table 2).

G2P[4] was most common strain in all age groups: 3–5 months (46.9% [95% CI: 29.1–65.3]; 6–11 months (56.0% [95% CI: 49.3–62.6]); 12–23 months (60.9% [95% CI: 56.6–65.0]); \geq 24 months (52.0% [95% CI: 46.0–58.0]). G1P[8] was the second most prevalent RV strain across the four age groups ranging between 6.3% and 18.6% (data not shown).

Between May 2008 and April 2009, the most commonly found multiple combination was G2P[Mixed] (83.8%; 31/37). GMixedP[4] (85.0%; 17/20) was frequently seen between May 2009 to April 2010. The majority (71.3%; 87/122) of either partially typed or fully untypeable RV strains were detected from May 2010 to May 2011 (Table 2). G2P[4] strains were identified throughout the study period, but predominated from May 2008 until December 2009. Frequency rates ranged from 100% (May and June 2008) to 29.4% (June 2009). G1P[8] RV strains could not be detected during the first 9 months of the study and were found at monthly low frequencies ranging from 2.5% (1/40) to 21.6% (6/37) from February 2009 until January 2010. An increase in G1P[8] strains was observed from May 2010 to May 2011, representing 36.6% (112/306) of the circulating strains (Fig 2).

DISCUSSION

The present analysis is an extension of a previous 12-month case-control study, which assessed the effectiveness of a full 2-dose series of RIX4414 vaccine in preventing severe RVGE hospitalization in Belém.²⁵ The total duration of our RV strain surveillance was 36 months during which time we assessed if any significant changes in the temporal distribution of RV strains were evident following the introduction RIX4414 in the Brazilian EPI.

Overall, RV was identified in 17.2% of children who received treatment for severe GE between May 2008 and May 2011. This proportion of RV-positive cases among all GE cases was much lower than that previously reported (46%) for Belém in 2003³², as well as other regions around Brazil ($>30\%$) before the introduction of the vaccine.^{17,33,34} This is consistent with recent findings which showed a marked decline (17%–40%) in hospitalizations for all-cause GE among children younger than one year, following the introduction of RV vaccination in Brazil in 2006.^{35,36}

The majority of hospitalizations for severe RVGE were seen in children aged at least 12 months (76.1%) as opposed to 24.0% in children younger than 12 months of age. This is in contrast with previous findings from Belém during the pre-vaccination period when about 48% of severe RVGE cases were observed in children aged one year or younger. It is likely that these changes in age distribution of RVGE have occurred as a result of introducing RV vaccine. This observation may warrant further analysis to assess whether long-term protection is sustained after 12 months of age, as demonstrated in pre-licensure efficacy studies. In this regard, phase III trials in Latin America and Europe have reported an efficacy for the first 2 years of life of 83% (73.1–89.7) and 96% (83–99.5), respectively, against hospital admission for rotavirus gastroenteritis^{37, 38} Furthermore, in Asia, over the first three years of life, vaccine efficacy against severe RVGE was 96.9% (95% CI: 88.3–99.6%).³⁹

The temporal profiles of RVGE were similar to those observed in previous studies conducted before the introduction of RV vaccine in Belém; the monthly distribution of cases peaked during the driest months of the year (July–September).^{32,40}

There was a striking increase in the relative prevalence of G2P[4], mainly during 2008 and 2009. This is in agreement with findings from Brazil and Latin America, where a sharp increase in the fully heterotypic G2P[4] RV strain was seen following the nationwide introduction of RIX4414.^{17–19,22,34} Moreover, during the first year of surveillance in Belem, when G2P4 accounted for 82.0% of RVGE hospitalizations, G2P4-specific VE was 75.4% (95% CI: 56.7– 86.0) using neighborhood controls and 38.9% (95% CI: 11.1–58.0) using hospital controls²⁵. In contrast to our results, that showed an increase in the prevalence of G1P[8] as from 2010, a recent 4-year follow-up study in Triângulo Mineiro, Brazil, showed that

G2P[4] largely predominated over the other circulating strains in 2010, possibly reflecting a continuation of an “epidemic cycle” in this region.¹⁹ These contrasting findings highlight the well-known temporal and geographical patterns in RV strains.^{9,34}

This ‘emergence’ of the G2P[4] strain may reflect a true shift in the RV strain distribution due to vaccine-induced selective pressure²⁰⁻²⁴ or a natural strain fluctuation.^{22,34,41-44} However, our 3-year RV strain distribution surveillance study in Belém provides additional evidence in support to the latter hypothesis, as the sharp decline in the relative prevalence rates of G2P[4] was followed by a significant increase in the detection of G1P[8] strains. Another recent study conducted in Northern Brazil found similar patterns; G2 strains displayed a typical cyclical pattern of occurrence and re-emergence during the 2006–2008 period.¹⁸ However, these findings remain inconclusive due to at least two reasons: Firstly, RIX4414 is composed of a G1P[8] species A, an RV strain related to the Wa-like genotype constellation, that fully differs from G2P[4] which possesses the DS-1-like genotype constellation.⁴² Secondly, the decline in prevalence rates of G2P[4] in our study might also be due to an increasing proportion of children aged below 5 years who had previously been infected by circulating G2P[4] strains and had developed homotypic immunity.

It seems unlikely that vaccine coverage in Belém played a role in determining a trend for increasing prevalence of G1P[8] strains from 2010, since rates of vaccination over 80% were achieved for the region between 2010 and 2011.¹² The trend for higher prevalence rates of G1P[8] could be interpreted as resulting from an apparent decline in protection after one year of age, as suggested by post-licensure studies conducted in Brazil and Latin America, even though further investigations on this particular issue are needed.^{25,34,45-47}

A remarkable variability was observed in co-circulating strains from January 2010 onwards; the majority were either partially typed or fully untypeable strains, or mixed infections. Mixed infections, predominantly represented by G2P[4]+P[6] and G1+G2P[4] strains were common throughout the study period, and could possibly challenge the RV vaccine effectiveness.^{9,48-49} Although cross-protection has been demonstrated involving common human strains with single G- or P- type, vaccine protection against rotaviruses bearing multiple antigenic specificities, some of which of possible animal origin, remains to be determined.

A finding of particular interest was the detection of a high proportion of untypeable RV strains during 2010-2011, in comparison with the previous follow-up period. This occurrence may reflect the circulation of common RV strains that underwent genetic variation, and is supported by studies showing that standard RT-PCR methods may fail to determine genotype-specificities, due to possible silent mutations in the primer-binding site.⁵⁰⁻⁵¹ The failure to identify some strains may be related to the circulation of unusual types for which G and/or P-specific primers were not used in our laboratory testing. In this context, it seems likely that we were unable to detect RVs bearing G12 type-specificity, which, according to a study in Northern Brazil, is a recently emerging strain.⁵²

Another plausible explanation for the emergence of new RV strains is that in our study, potential zoonotic strains (G9P[6]) and strains which are likely to originate from reassortment between human and animal RV strains (G1P[6] and G2P[6]) were detected at very low frequencies, suggesting that they do not spread efficiently among humans. Nonetheless, we cannot rule out the possibility that such unusual strains were generated through reassortment events involving common circulating human strains and the emerging G12P[6] strain.

A possible limitation of this study includes the difference in sample size over the four years, with the first two years covering 80% of severe GE cases in Belem and the remaining two years covering only 50% of cases. In addition, the set of primers we used did not target either the G12 or G5 type-specificities. Of particular interest is that we may have missed detecting G12 RV strains bearing either P[6] or P[8] genotype-specificities. These are known to have emerged worldwide and may possibly have arrived in the Northern region of Brazil.⁵²⁻⁵³ An

additional limitation of the current study was the lack of complete analysis of the entire RV genotype constellations for a long-term assessment of vaccine effect on strain type, as based on the currently adopted classification of rotaviruses¹⁶. Finally, although the monitoring of RV strains in our study was conducted over a relatively extended period, continued surveillance could help detect trends for the occurrence of prevailing strains that may pose a challenge to the currently licensed RV vaccines.

In conclusion, G2P[4] was predominantly observed during the first 20 months of our study, followed by G1P[8], suggestive of a potential natural fluctuation of RV strains over time rather than a vaccine-induced selective pressure on circulating RV strains

REFERENCES

- 1.Parashar UD, Gibson CJ, Bresee JS,et al. Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerg Infect Dis*. 2006;2:304–306.
- 2.CDC Rotavirus Surveillance-worldwide. 2011(5th edition):chapter 13–2
- 3.WHO. *Wkly Epidemiol Rec* 2013;88:49–54.
- 4.Desai R, Oliveira LH, Parashar UD, et al. Reduction in morbidity and mortality from childhood diarrhoeal disease after species A rotavirus vaccine introduction in Latin America - a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011;8:907–11.
- 5.Sartori AMC, Valentim J, Soárez PC, et al. Rotavirus morbidity and mortality in children in Brazil. *Rev Pan de Salud Pública*. 2008;23(2):92-100.
6. Grimwood L, Lambert SB. Rotavirus vaccines. Opportunities and challenges. *Hum Vaccin*. 2009;5:57-69.
- 7.WHO.Immunization profile–Bahrain. Available at: <http://apps.who.int/vaccines/globalsummary/immunization/countryfileresult.cfm?C=bhr>. Accessed February 22, 2013.
- 8.Trojnar E, Sachsenröder 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. *J Gen Virol*. 2013;94(Pt 1):136–142.
- 9.Santos N, Hoshino Y. Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *Rev Med Virol*. 2005 Jan-Feb;15(1):29–56.
- 10 .O’Ryan M. The ever-changing landscape of rotavirus serotypes. *Pediatr Infect Dis J*. 2009;28(3):S60–S2.
- 11.Matthijnssens J, De Grazia S, Piessens 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. *Infect Genet Evol*. 2011;11(6):1396–1406.
12. DATASUS. Imunizações. Cobertura por ano e região. Accessed at: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohm.exe?pni/cnv/pniuf.def>. Last access: September 13, 2013.
- 13.Patel MM, Steele D, Gentsch JR, et al. Real-world impact of rotavirus vaccination. *Pediatr Infect Dis J*. 2011 (1 Suppl):S1–5.
- 14.Tate JE, Patel MM, Steele AD, et al. Global impact of rotavirus vaccines. *Expert Rev Vaccines*. 2010;9(4):395–407.
- 15.Gentsch JR, Parashar UD, Glass RI. Impact of rotavirus vaccination: the importance of monitoring strains. *Future Microbiol*. 2009;4(10):1231–1234.
- 16.Matthijnssens J, Nakagomi O, Kirkwood CD, et al.Group A rotavirus universal mass vaccination: how and to what extent will selective pressure influence prevalence of rotavirus genotypes. *Expert Rev Vaccines*. 2012;11(11):1347–1354.

17. Carvalho-Costa FA. Laboratory-based rotavirus surveillance during the introduction of a vaccination program, Brazil. *Pediatr Infect Dis J*. 2011(Suppl 1):S35–41.
18. Oliveira A, Mascarenhas JDAP, Soares LS, et al. Rotavirus serotype distribution in northern Brazil trends over a 27 year period pre and post national vaccine introduction. *Trials in Vaccinology*. 2012;1(0):4–9.
19. Dulgheroff A, Figueiredo E, Moreira L, et al. Distribution of rotavirus genotypes after vaccine introduction in the Triângulo Mineiro region of Brazil: 4-year follow-up study. *J Clin Virol*. 2012. 55(1):67–71.
20. Gurgel RQ, Cunliffe NA, Nakagomi O, et al. Rotavirus genotypes circulating in Brazil before national rotavirus vaccination: a review. *J Clin Virol*. 2008;43(1):1–8.
21. Van Doorn LJ, Kleter B, Hoefnagel E, et al. Detection and genotyping of human rotavirus VP4 and VP7 genes by reverse transcriptase PCR and reverse hybridization. *J Clin Microbiol*. 2009;47(9):2704–2712.
22. Leite JPG, Carvalho-Costa FA, Linhares AC. Group A rotavirus genotypes and the ongoing Brazilian experience: A review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2008;103(8): 745–753.
23. Linhares AC, Stupka JA, Ciapponi A, et al. Burden and typing of rotavirus group A in Latin America and the Caribbean: systematic review and meta-analysis. *Rev Med Microbiol*. 2011;21(2):89–109.
24. Nakagomi T, Cuevas L, Gurgel R, et al. Apparent extinction of non-G2 rotavirus strains from circulation in Recife, Brazil, after the introduction of rotavirus vaccine. *Arch Virol*. 2008;153(3):591–593.
25. Justino MCA, Linhares AC, Lanzieri TM, et al. Effectiveness of the monovalent G1P [8] human rotavirus vaccine against hospitalization for severe G2P [4] rotavirus gastroenteritis in Belém, Brazil. *Pediatr Infect Dis J*. 2011;30(5):396–401.
26. Boom R, Sol C, Salimans M, Jansen C, et al. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol*. 1990;28(3):495–503.
27. Das BK, Gentsch JR, Cicirello HG, et al. Characterization of rotavirus strains from newborns in New Delhi, India. *J Clin Microbiol*. 1994;32(7):1820–1822.
28. Gentsch JR, Glass R, Woods P, et al. Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*. 1992;30(6):1365–1373.
29. Gouvea V, Glass RI, Woods P, et al. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *J Clin Microbiol*. 1990;28(2):276–282.
30. Leite J, Alfieri A, Woods P, et al. Rotavirus G and P types circulating in Brazil: characterization by RT-PCR, probe hybridization, and sequence analysis. *Arch Virol*. 1996;141(12):2365–2374.
31. Iturriza-Gómara M, Dallman T, Bányai K, et al. Rotavirus genotypes co-circulating in Europe between 2006 and 2009 as determined by EuroNet, a pan-European collaborative strains surveillance network. *Epidemiol Infect*. 2011;139(6):895–909.
32. Linhares AC. Rotavirus gastroenteritis in Latin America: A hospital-based study in children under 3 years of age. *Trials in vaccinology*. 2012;1:36–41.
33. Munford V, Gilio AE, de Souza EC, et al. Rotavirus gastroenteritis in children in 4 regions in Brazil: a hospital-based surveillance study. *J Infect Dis*. 2009;200(S1):S106–S113.
34. O’Ryan M, Lucero Y, Linhares AC. Rotarix®: vaccine performance 6 years postlicensure. *Exp Rev Vaccines*. 2011;10(12):1645–1659.
35. Do Carmo GM, Yen C, Cortes J, et al. Decline in diarrhea mortality and admissions after routine childhood rotavirus immunization in Brazil: a time-series analysis. *PLoS med*. 2011;8(4): e1001024.
36. Lanzieri, Tatiana M., et al. Impact of rotavirus vaccination on childhood deaths from diarrhea in Brazil. *Int J Infect Dis* 15.3 (2011): e206–e210.
37. Linhares AC, Velázquez FR, Pérez-Schael I, et al. Efficacy and safety of oral live attenuated human rotavirus vaccine against rotavirus gastroenteritis during the first 2 years of life in Latin American infants: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase III study. *Lancet*. 2008;371(9619):1181–1189.

38. Vesikari T, Karvonen A, Prymula R, et al. Efficacy of human rotavirus vaccine against rotavirus gastroenteritis during the first 2 years of life in European infants: randomised, double-blind controlled study. *Lancet*. 2007;370(9601):1757-1763.
39. Phua KB, Lim SF, Lau YL, et al. Rotavirus vaccine RIX4414 efficacy sustained during the third year of life: a randomised clinical trial in an Asian population. *Vaccine*. 2012;30(30):4552-4557.
40. Linhares A, Gabbay Y, Mascarenhas J, et al. Immunogenicity, safety and efficacy of tetravalent rhesus-human, reassortant rotavirus vaccine in Belem, Brazil. *Bulletin of the World Health Organization*. 1996;74(5):491.
41. Esteban LE, Rota RP, Gentsch JR, et al. Molecular epidemiology of group A rotavirus in Buenos Aires, Argentina 2004–2007: reemergence of G2P [4] and emergence of G9P [8] strains. *J Med Virol*. 2010;82(6):1083–1093.
42. Matthijnssens J, Van Ranst M. Genotype constellation and evolution of group A rotaviruses infecting humans. *Curr Opin Virol*. 2012;2(4):426–433.
43. Kirkwood CD, Boniface K, Barnes GL, et al. Distribution of rotavirus genotypes after introduction of rotavirus vaccines, Rotarix® and RotaTeq®, into the National Immunization Program of Australia. *Pediatr Infect Dis J*. 2011;30(1):S48–S53.
44. Sáfiadi MAP, Berezin EN, Munford V, et al. Hospital-based surveillance to evaluate the impact of rotavirus vaccination in Sao Paulo, Brazil. *Pediatr Infect Dis J*. 2010;29(11):1019–1022.
45. Correia JB, Patel MM, Nakagomi O, et al. Effectiveness of monovalent rotavirus vaccine (Rotarix) against severe diarrhea caused by serotypically unrelated G2P [4] strains in Brazil. *J Infect Dis*. 2010;201(3):363–369.
46. De Palma O, Cruz L, Ramos H, et al. Effectiveness of rotavirus vaccination against childhood diarrhoea in El Salvador: case-control study. *BMJ*. 2010;340.
47. Patel M, Pedreira C, De Oliveira LH, et al. Duration of protection of pentavalent rotavirus vaccination in Nicaragua. *Pediatr*. 2012;130(2):e365–e372.
48. Gentsch JR, Laird AR, Bielfelt B, et al. Serotype diversity and reassortment between human and animal rotavirus strains: implications for rotavirus vaccine programs. *J Infect Dis*. 2005;192(S1):S146–S59.
49. Gentsch JR, Woods P, Ramachandran M, 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(S1):S30–S36.
50. Fischer T, Eugen-Olsen J, Pedersen AG, et al. Characterization of rotavirus strains in a Danish population: high frequency of mixed infections and diversity within the VP4 gene of P[8] strains. *J Clin Microbiol*. 2005;43(3):1099-10104.
51. Iturriza-Gómara M, Green J, Brown DW, et al. Diversity within the VP4 gene of rotavirus P[8] strains: implications for reverse transcription-PCR genotyping. *J Clin Microbiol*. 2000;38(2):898–901.
52. Soares LS, dos Santos Lobo P, Mascarenhas JDAP, et al. Identification of lineage III of G12 rotavirus strains in diarrheic children in the Northern Region of Brazil between 2008 and 2010. *Arch Virol*. 2012;157(1):135–139.
53. Matthijnssens J, Heylen E, Zeller M, et al. Phylodynamic analyses of rotavirus genotypes G9 and G12 underscore their potential for swift global spread. *Mol Biol Evol*. 2010;27(10):2431–2436.

TABLES AND FIGURES

Table 1 – Demographic characteristics of children <5 years of age (N = 1078)

Characteristics	Categories	n	Value	%
Age [Months]	Mean	1078	18.5	-
	SD		9.4	
Gender	Female	509	-	47.2
	Male	569	-	52.8
Ethnicity	American	1078	-	100
	Hispanic or Latino			
Race	African heritage	35	-	3.3
	Asian heritage	1	-	0.1
	White Caucasian	11	-	1.0
	Other*	1030	-	95.6
	Missing	1	-	0.1
Currently live in Belem	Yes	971	-	90.1
	No	107	-	9.9

N = number of severe RVGE hospitalisations

n = number of subjects in a given category

Value = value of the considered parameter

% = $n/N \times 100$

Other*=Mixed race

SD = Standard Deviation

Table 2 - Distribution of rotavirus strains between 2008 and 2011 in Belém, Brazil
(N=1076)[‡]

Genotype	May 2008 to April 2009		May 2009 to April 2010		May 2010 to May 2011		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Common human strains								
G1P[8]	11	2.1	37	14.5	112	38.0	160	14.9
G2P[4]	434	82.7	123	48.0	57	19.3	614	57.1
G3P[8]	0	0.0	0	0.0	1	0.3	1	0.1
G9P[8]	2	0.4	18	7.0	1	0.3	21	2.0
Reassortants among common human strains								
G1P[4]	0	0.0	3	1.2	0	0.0	3	0.3
G9P[4]	2	0.4	1	0.4	0	0.0	3	0.3
Potential zoonotic strains								
G9P[6]	1	0.2	1	0.4	0	0.0	2	0.2
Possible human-animal hybrid strains								
G1P[6]	1	0.2	3	1.2	6	2.0	10	0.9
G2P[6]	14	2.7	4	1.6	1	0.3	19	1.8
G12P[6]	11	2.1	0	0.0	0	0.0	11	1.0
Mixed infections(single G-genotype with ≥ 2 P genotypes)								
G1P[4]+P[6]	0	0.0	1	0.4	0	0.0	1	0.1
G1P[4]+P[8]	2	0.4	1	0.4	3	1.0	6	0.6
G1P[6]+P[8]	1	0.2	1	0.4	1	0.3	3	0.3
G2P[4]+P[6]	25	4.8	4	1.6	2	0.7	31	2.9
G2P[4]+P[8]	1	0.2	2	0.8	5	1.7	8	0.7
G4P[4]+P[6]+P[8]	1	0.2	0	0.0	0	0.0	1	0.1
G12P[4]+P[6]	2	0.4	0	0.0	0	0.0	2	0.2
G2P[4]+P[6]+P[8]	5	1.0	0	0.0	0	0.0	5	0.5
Mixed infections (multiple G-genotypes with a single P-genotype)								
G1+G2P[4]	2	0.4	14	5.5	8	2.7	24	2.2

G1+G2P[6]	0	0.0	0	0.0	2	0.7	2	0.2
G1+G2P[8]	1	0.2	1	0.4	0	0.0	2	0.2
G1+G9P[4]	0	0.0	1	0.4	0	0.0	1	0.1
G1+G9P[8]	0	0.0	2	0.8	3	1.0	5	0.5
G1+G2+G9P[4]	0	0.0	2	0.8	0	0.0	2	0.2
Mixed infections (multiple G- and P-genotypes)								
G1+G2P[4]+P[6]	1	0.2	3	1.2	0	0.0	4	0.4
G1+G2P[4]+P[8]	0	0.0	1	0.4	6	2.0	7	0.7
G1+G2P[6]+P[8]	1	0.2	0	0.0	0	0.0	1	0.1
G2+G9P[4]+P[8]	0	0.0	2	0.8	0	0.0	2	0.2
G1+G2P[4]+P[6]+P[8]	2	0.4	1	0.4	0	0.0	3	0.3
Partially genotyped (G-genotyped and P-untypeable)								
G1P[NT]	0	0.0	8	3.1	15	5.1	23	2.1
G2P[NT]	1	0.2	4	1.6	5	1.7	10	0.9
G9P[NT]	0	0.0	1	0.4	0	0.0	1	0.1
G1+G2P[NT]	0	0.0	1	0.4	1	0.3	2	0.2
G1+G9P[NT]	0	0.0	4	1.6	1	0.3	5	0.5
Partially genotyped (G-untypeable and P-genotyped)								
GNTTP[6]	2	0.4	8	3.1	41	13.9	51	4.7
GNTTP[4]+P[6]	1	0.2	0	0.0	0	0.0	1	0.1
G and P-untypeable								
GNTTP[NT]	1	0.2	4	1.6	24	8.1	29	2.7
Total	525	100	256	100	295	100	1076	100

‡2 samples were excluded from RV-testing by PCR

n = number of subjects in a given category; N = number of severe RVGE hospitalisations

FIGURE 1. Temporal distribution of hospitalised GE cases and rotavirus positivity rates in Belém, Brazil, between May 2008 and May 2011

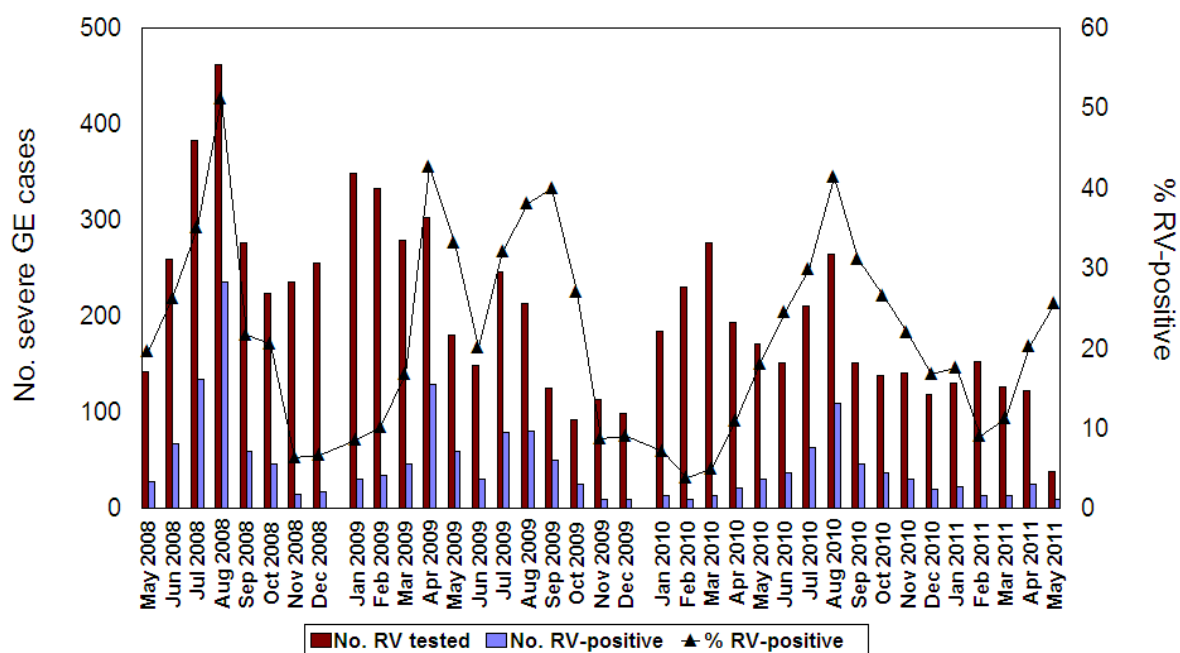
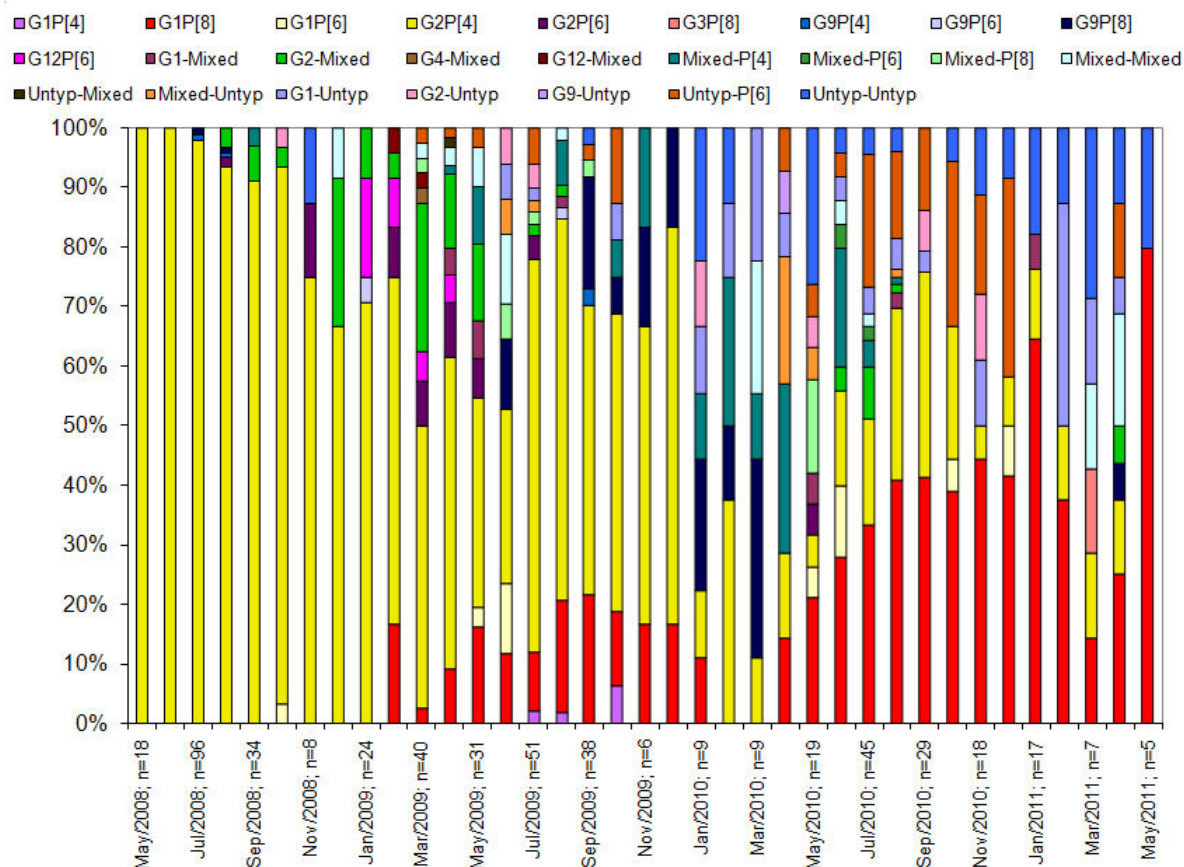


FIGURE 2. Monthly distribution of circulating rotavirus genotypes from hospitalised children with GE in Belém, Brazil, between May 2008 and May 2011



6.3 ARTIGO III

Artigo em redação.

TITLE: Rotavirus vaccination status and clinical aspects among children hospitalised for acute gastroenteritis in Belém, Brazil

Target Journal: **The Pediatric Infectious Disease Journal**

Authors: Maria Cleonice A. Justino¹, Patrícia Brasil², Suely Tuboi³, Yllen Miranda¹, Erika Abreu¹, Veronilce B da Silva¹ e Alexandre C. Linhares^{1*}

Affiliations:

¹ Instituto Evandro Chagas, Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, Ananindeua, Pará, Brazil

² Instituto de Pesquisa Clínica, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil

³ GlaxoSmithKline Biologicals, Rio de Janeiro, Brazil

***Address for correspondence and reprints:** Alexandre C Linhares, MD, PhD, Instituto Evandro Chagas, Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, Belém, Brazil, Rodovia BR 316, Km 7, Ananindeua, Pará, Brasil. Telephone: +55 91 32142007; Fax: +55 91 321406; ; email: alexandrelinhares@iec.pa.gov.br

Conflicts of interest and Source of Funding: This work was supported by GlaxoSmithKline Biologicals and Instituto Evandro Chagas, Health Surveillance Secretariat, Brazilian Ministry of Health. AC Linhares was the principal investigator of studies with the Human Rotavirus Vaccine (Rotarix[®]) in Belém, Brazil, and MCA Justino was the clinical coordinator of these studies. Both investigators are affiliated to Instituto Evandro Chagas, Health Surveillance Secretariat, Brazilian Ministry of Health, which received research funding from GlaxoSmithKline Biologicals.

Key words: Rotavirus; gastroenteritis, severity, vaccination status

Abbreviated title: Rotavirus vaccination status and clinical severity

Running head: Rotavirus clinical severity

ABSTRACT

Background: In March 2006 Brazil introduced the monovalent rotavirus (RV) vaccine RIX4414 (*Rotarix*TM, GlaxoSmithKline Biologicals) into the Expanded Program on Immunisation (EPI), following a vaccination schedule at age 2 and 4 months. The effectiveness of rotavirus vaccine against severe rotavirus gastroenteritis (RVGE) was demonstrated in post-licensure studies in Brazil. This study assessed the severity of RVGE according to the vaccination status among hospitalized children

Methods: A prospective hospital-based surveillance was conducted between May 2008 and May 2011 in four paediatric hospitals in Belém, Brazil. Stool specimens were obtained from children aged ≥ 12 weeks and born after March 6, 2006 and analysed for RV by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Data on clinical symptoms were collected and the severity of RVGE was graded by a 20-point scoring system and individual symptoms and current feeding practice analyzed separately. As based on the vaccination status the children were described as not vaccinated, partially vaccinated (one dose) and fully vaccinated (two doses).

Results: A total of 1023 RVGE episodes were identified among not vaccinated ($n = 252$), partially vaccinated ($n = 156$) and fully vaccinated ($n = 615$) children during the 3-year surveillance period. Very severe GE (scored ≥ 15) was reported in 16.7%, 17.9% and 13.5% of not vaccinated, partially vaccinated and fully vaccinated children, respectively. Unvaccinated children were more likely to have very severe disease [Odds ratio (OR) = 1.49; 95% CI: 0.97-2.28; $p = 0.07$], as compared to fully vaccinated children. There was a trend for a shorter duration of RV-related diarrhoea among vaccinated children than in not vaccinated children ($p = 0.07$). A protective effect of vaccination was noted when mean duration of general symptoms and hospital stay are analysed when comparing unvaccinated, partially vaccinated and fully vaccinated children ($p < 0.05$).

Conclusions: We showed a vaccination dose effect trend, with fully vaccinated children having less severe RVGE requiring hospitalization than not vaccinated and partially vaccinated children.

INTRODUCTION

World-wide, rotavirus (RV) infection is the leading cause of severe gastroenteritis among infants and young children, causing an estimated 453,000 deaths annually in children aged less than 5 years [Tate et al., 2012]. Over 80% of these RV-related deaths occur in low-income countries in Asia and Sub-Saharan Africa, where access to RV vaccines and timely medical care is often limited or unavailable. In the pre-vaccination period the burden of rotavirus disease in Brazil translated into approximately 92,000 hospitalizations and 850 deaths annually among children aged less than 5 years [Sartori et al., 2008].

RV infection shows a wide spectrum of disease, ranging from asymptomatic to severe illness that usually course with diarrhoea, vomiting, abdominal pain and fever which in general persist for 3 to 8 days. Dehydration, loss of appetite and metabolic acidosis represent major sequelae of RV infection, being especially harmful for the youngest children and lead to death [Dennehy, 2012]. Although RVs exhibit broad diversity, only strains carrying either G1, G2, G3, G4 or G9 genotype-specificity, combined with P[4] or P[8] genotypes, are currently recognised as the most commonly found infecting humans [Santos, Hoshino, 2008]. Furthermore, a possible relationship between RV genotypes and clinical severity remains to be determined.

In Brazil, the live-attenuated monovalent human RV vaccine (Rotarix[®]; GlaxoSmithKline Biologicals, Rixensart, Belgium) was introduced into the National Immunisation Program in March 2006, covering a birth cohort of >3 million infants [Ministério da Saúde, 2013]. Over the past seven years at least two case-control effectiveness studies were conducted in Brazil which reaffirmed the good vaccine efficacy against severe RV disease shown during phase III trials in Latin America, including Brazil [Correia et al., 2010; Justino et al., 2011; Linhares et al., 2008; Ruiz-Palacios et al., 2006]. In addition, there have been several observational studies throughout the country showing a consistent reduction over time in the number of all-cause and RV-related GE hospitalizations and deaths among children aged <1 year [O’Ryan et al., 2011].

It has become apparent from several efficacy/effectiveness studies with RV vaccines that there is a gradient of vaccine-induced protection, with enhanced efficacy against the most severe disease, with the vaccine being least effective in preventing disease of mild to moderate severity [Justino et al., 2011; O’Ryan et al., 2011]. In general RV vaccine efficacy/effectiveness according to clinical severity was evaluated in fully vaccinated children and results were presented using a 20-point scoring system as proposed by Ruuska and Vesikari [1990], therefore allowing cross-study comparisons. However, there is a lack of studies assessing the RV vaccine protection in partially vaccinated children and using individual clinical indicators of severity. Since RVGE may eventually be identified among vaccinated children, in this study we sought to evaluate the clinical severity of RVGE leading to hospitalization, according to the vaccination status of not vaccinated, partially vaccinated or fully vaccinated children.

MATERIALS AND METHODS

Study setting and patients

This was essentially a prospective, hospital-based study conducted in Belém, North Brazil that started in May 2008 and was completed in May 2011. During the first year of the study, that was undertaken between May 2008 and April 2009, a case-

control analysis was performed in four large urban paediatric/clinic hospitals with the main objective to estimate the effectiveness of Rotarix[®]; a concomitant surveillance for circulating rotavirus strains was also conducted. As based on previous surveillance studies in Belém [Linhares et al., 2012], these paediatric/clinic hospitals received approximately 80% of all paediatric admissions for GE in Belém area. During the remainder three-year study period (May 2009-May 2011) the surveillance for GE cases continued in two hospitals that accounted for approximately 50% of all hospitalizations in Belém area.

The study was approved by the Ethical Review Committee of the Instituto Evandro Chagas, Health Surveillance Secretariat, Brazilian Ministry of Health's National Reference Centre, and was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and Good Clinical Practices. A written informed consent form was obtained from parents/legal guardians of all children prior to their study entry.

Eligible children were aged at least 12 weeks, born after March 6, 2006 (the date when universal RV vaccination with Rotarix[®] was started in Brazil, following a vaccination schedule of 2 and 4 months). Study cases included children hospitalised for laboratory-confirmed severe RVGE, defined as three or more liquid/semi-liquid motions in a 24-hour period, of less than 14 days duration, requiring at least one overnight stay and intravenous rehydration therapy. According to their vaccination status, enrolled subjects were categorised as fully vaccinated (children who had received two doses of Rotarix[®]), partially vaccinated (one dose) and not vaccinated (no written records of Rotarix[®]).

Parents/guardians were interviewed for information on demographics, medical history, feeding practices and specific symptoms; in addition, data was gathered from reviewing medical records at the paediatric hospitals. The severity of RVGE was graded using a 20-point scoring system, as proposed by Ruuska & Vesikari, 1990, where cases with clinical scores of 1-10, ≥ 11 and ≥ 15 were defined as mild/moderate, severe and very severe, respectively. Analyses were performed to evaluate the association between disease severity, individual symptoms and current feeding practice against vaccination status.

Laboratory procedures

Stool samples were routinely collected within 48 hours following hospitalization and transported to IEC where testing was performed for the presence of RV antigen using a sandwich-type commercial enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) that utilises monoclonal antibody directed towards Group A VP6 (RIDASCREEN[®] Rotavirus; R-Biopharma, Darmsdadt, Germany). The tests were performed following the manufacturer's instructions and included positive and negative controls.

Statistical analyses

Data were statistically analysed using SAS version 9.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC). Analyses were performed using chi-square or Fisher's exact test, as appropriate, for categorical variables. In addition, analyses of variance (ANOVA) or Kruskal Wallis tests for continuous variables. All tests were two-tailed and differences between variables were considered statistically significant at P -values ≤ 0.05 . Multinomial logistic regression was performed to assess the effect of the risk factors such as age, vaccination status and current feeding practices, on the disease severity

measured by the Ruuska & Vesikari Clinical Score and graded as mild/moderate (<11), severe (≥ 11 -<15) and very severe (≥ 15).

RESULTS

Altogether there were 1023 RVGE episodes among not vaccinated ($n = 252$), partially vaccinated ($n = 156$) and fully vaccinated ($n = 615$) children during the 3-year surveillance period. The Vesikari scoring system was calculated in 497 (48.5%) patients. Very severe GE (scored ≥ 15) was reported in 16.7%, 17.9% and 13.5% of not vaccinated, partially vaccinated and fully vaccinated children, respectively ($P = 0.10$) (data not shown). The clinical severity of rotavirus gastroenteritis according to the Vesikari scoring system is compared to age, vaccination status and feeding practice among children in Belém, Brazil, is shown in Table 1. It was observed that, compared to less severe cases, odds of having a severe disease is 1.4 [$1.4 = 1/0.68$; Ratio used since coefficient of regression β was negative ($\beta = -0.3830$)], times less for every month increase in age ($P = 0.04$) and odds of having a very severe case was 1.51 [$1.51 = 1/0.66$, Ratio used since coefficient of regression β was negative ($\beta = -0.4103$)] times less for every month increase in age ($P = 0.09$), meaning that younger children had more severe disease. Odds of having a severe disease was 1.14 greater for partially vaccinated children, as compared to fully vaccinated children, although this did not reach a statistically significant difference ($P = 0.54$). Similarly, the odds of having a very severe disease was 1.49 greater for partially vaccinated children, compared to fully vaccinated children ($P = 0.11$). Odds of having a severe disease was 1.46 greater for not vaccinated, compared to fully vaccinated children ($P = 0.02$). Odds of having a very severe disease was 1.49 greater for not vaccinated compared to fully vaccinated ($P = 0.07$). There was also no statistically significant difference if the odds of developing severe disease are analysed according to the feeding practices.

The proportion of RV SGE cases according to the vaccination status and the intensity of individual symptoms, as determined by Vesikari clinical scale, is shown in Table 2. Overall, there was a trend for shorter duration of diarrhoea among vaccinated children, as compared to not vaccinated children ($P = 0.07$). Similar proportions were observed when comparing not vaccinated, partially vaccinated and fully vaccinated children who developed diarrhoea of the shortest (1-4 days) duration: 92.2% (202/252); 92.5% (124/156); and 95.5% (511/556). No statistically significant differences were seen among the other clinical categories according to the vaccination status, with P values in the range of 0.16 (duration of vomiting in days) to 0.84 (need for IV rehydration).

Table 3 demonstrates the differences in the duration of general symptoms during hospitalization, according to the vaccination status. The mean duration of all individual symptoms was higher among not vaccinated children, as compared to vaccinated children (P values in the range of 0.003 to 0.05). Overall, the mean duration (in days) of hospitalization ranged from 5.02 to 4.72 in not vaccinated and fully vaccinated children respectively.

DISCUSSION

The present study found that children who underwent a full rotavirus vaccination schema (2 doses of *Rotarix*[®] at 2 and 4 months of age) are less likely to develop severe RVGE requiring hospitalization than either partially vaccinated or not vaccinated children. These results were obtained from an exploratory analysis performed within a long-term (May 2008 to May 2011) hospital-based study for RVGE among children in Belém, Northern Brazil, with the primary objective of evaluating the

effectiveness of *Rotarix*TM full series vaccination in preventing severe RV disease (May 2008 to May 2009), with continued surveillance for severe RVGE cases and monitoring of RV strains during additional two years [Justino et al., 2011; Guerra et al., submitted].

According to official data from the Expanded Program on Immunisation (EPI), vaccine coverage rates in the Northern and North-Eastern regions of Brazil are in general lower than in other regions, possibly due to limited access to the health services in these less country's less developed settings [DATASUS, 2013]. Vaccine coverage rates in Northern Brazil ranged from 64.3% to 72.3% from 2008 to 2011, therefore allowing for a comparison of clinical severity between RVGE episodes that occurred among fully vaccinated, partially vaccinated and not vaccinated children in Belém, Brazil. This appears to be in line with our study where the majority of subjects (around 75%) were previously vaccinated with at least one dose of *Rotarix*TM, with 60.1% of them having received a full-course vaccination.

It is well-known that rotavirus vaccination strategies target mainly severe RVGE which may course with dehydration and electrolyte disturbances, and that protection against more severe episodes is evident even among partially vaccinated children, that is, those who received an incomplete regimen of either of the licensed vaccines [Dennehy et al., 2012; Justino et al., 2011; Salinas et al., 2005; Wang et al., 2012]. To our knowledge, however, there have been no studies to assess whether the clinical severity of RVGE episodes differ between vaccinated and not vaccinated children. In general our data showed that rates of very severe RVGE episodes were similar between fully vaccinated (16.7%) and partially vaccinated (17.9%) children, both of which being higher than for those children who were not vaccinated (13.5%). Although the administration of a full-series, two-dose vaccination schema is strongly recommended to achieve protection with *Rotarix*[®] [WHO, 2009], our findings appear to account for broadening the benefits of a partially-completed rotavirus vaccine series, a condition that may not be too rare in less developed settings, like ours. In addition, the data from our secondary analysis suggest that a significant protection against the most severe RVGE can be reached early in the course of vaccination, and this may be of particular relevance if initiated, for instance, in the midst of an epidemic season.

In our analysis the Vesikari score could be applied to half of the children, probably cause in this scale the assessment of dehydration is measuring acute weight loss and different signs and symptoms which may complete for exact calculation. Of note, not all children had all clinical parameters required to. It was shown that utilizing the Ruuska & Vesikari's clinical scale there was no difference in the likelihood of developing severe RV disease if compared partially and fully vaccinated children. In contrast, not vaccinated children were much more prone to develop severe and very severe RVGE if compared to fully vaccinated children. Of interest, it was observed that the dose-effect trend in protecting against severe RV disease became more evident when analysed in regards to the mean duration of individual symptoms which was higher among not vaccinated children, as compared to vaccinated children. The difference in mean duration of symptoms in days compared to vaccination status was statistically significant, it is especially important in children under 2 years old of age since the longer duration of symptoms may lead to prolonged hospital stay. In summary there was a shorter duration of symptoms among fully vaccinated children as compared to unvaccinated. RV vaccination may reduces the burden of RV disease in Brazil at a reasonable cost-effectiveness ratio according to previous findings [Constenla et al., 2008; O'Ryan et al., 2011].

Although rotavirus genotype G9 was suggested to be associated with a more-severe disease in Latin America [Linhares et al., 2006], this specific type accounted for only 2% of circulating strains during our three-year study [Guerra et al., submitted]. Moreover, differences in disease severity may not be related to variation in virulence

between different RV strains but be rather a result of introduction of new strains into a community [Gentsch et al., 1996]. It seems unlikely that age at which the child had an episode of RVGE and the feeding practice had introduced a selection bias in our analyses, since no statistically significant differences were seen between the vaccination status categories when analysing the odds of developing severe disease according to these two characteristics.

Since introduction of RV vaccination in Brazil in 2006 a significant reduction in GE-related hospitalizations and deaths was observed across the country, particularly among children aged <1 year [O’Ryan et al., 2011]. Our analysis demonstrating that less severe RV disease is observed among (partially of fully) vaccinated children, as compared to not vaccinated children, suggests that intensity of clinical parameters (particularly the duration of symptoms) might have accounted to this outcome.

We have also shown that simple clinical parameters may be utilized to study effectiveness of RV vaccination, instead of the Vesikari scale, which utilize subjectives and hard parameters to define.

REFERENCES

1. Tate JE, Burton AH, Boschi-Pinto C, Steele AD, Duque J, Parashar UD, et al. 2008 estimate of worldwide rotavirus-associated mortality in children younger than 5 years before the introduction of universal rotavirus vaccination programmes: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 2012; 12: 136-41.
2. Sartori AMC, Valentim J, Soárez PC, et al. Rotavirus morbidity and mortality in children in Brazil. *Rev Pan de Salud Pública.* 2008;23:92-100.
3. Dennehy PH. Rotavirus infection. An update on management and prevention. *Advances in Ped.* 2012;59:doi:10.1016/j.yapd.2012.04.002.
4. Santos N, Hoshino Y. Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *Rev Med Virol.* 2005;15:29–56.
5. Brazilian Ministry of Health [Technical note 193/2012: change in recommended age for administration of measles-mumps-rubella vaccine and oral rotavirus vaccine from January 2013]. Brasília, Brazil: National Immunization Program, Secretariat of Epidemiologic Surveillance, Ministry of Health (2012).
6. Correia JB, Patel MM, Nakagomi O, et al. Effectiveness of monovalent rotavirus vaccine (Rotarix) against severe diarrhea caused by serotypically unrelated G2P [4] strains in Brazil. *J Infect Dis.* 2010;201:363–369.
7. Justino MCA, Linhares AC, Lanzieri TM, et al. Effectiveness of the monovalent G1P [8] human rotavirus vaccine against hospitalization for severe G2P [4] rotavirus gastroenteritis in Belém, Brazil. *Pediatr Infect Dis J.* 2011;30(5):396–401.
8. Linhares AC, Velázquez FR, Pérez-Schael I, et al. Efficacy and safety of oral live attenuated human rotavirus vaccine against rotavirus gastroenteritis during the first 2 years of life in Latin American infants: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase III study. *Lancet.* 2008;371:1181-1189.

9. Ruiz-Palacios GM, Pérez-Schael I, Velázquez FR et al. Safety and efficacy of an attenuated vaccine against severe rotavirus gastroenteritis. *N Eng. J Med.* 2006;354:11-22.
10. O'Ryan M, Lucero Y, Linhares AC. Rotarix®: vaccine performance 6 years postlicensure. *Exp Rev Vaccines.* 2011;10:1645–1659.
11. Ruuska T, Vesikari T. Rotavirus disease in Finnish children: use of numerical scores for clinical diarrhoeal episodes. *Scand J Infect Dis.* 1990;22 :259-267.
12. Linhares AC, Macias-Parra M, Sáez-Llorens X, Vergara R et al. Rotavirus gastroenteritis in Latin America: A hospital-based study in children under 3 years of age. *Trials Vaccinol.* 2012;1:36-41.
13. Guerra SFS, Linhares AC, Mascarenhas, JDP, Oliveira A et al. Rotavirus surveillance for three years following the introduction of rotavirus vaccine in Belém, Brazil. *Pediatr Infect Dis J.* Submitted.
14. DATASUS. Imunizações. Cobertura por ano e região. Accessed at: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohm.exe?pni/cnv/pniuf.def>. Last access: Last access September 13, 2013.
15. Salinas B, Linhares AC, Ruiz-Palacios GM, Guerrero ML et al. Evaluation of safety, immunogenicity and efficacy of an attenuated rotavirus vaccine, RIX4414. A randomized, placebo-controlled trial in Latin American infants. *Pediatr Infect Dis J.* 2005;24:807-816.
16. Wang FT, Mast C, Glass JR, Loughlin J et al. Effectiveness of an incomplete RotaTeq® (RV5) vaccination regimen in preventing rotavirus gastroenteritis in the United States. *Pediatr Infect Dis J.* doi:10.1097/INF.0b013e318275328f.
17. WHO. *Rotavirus vaccines: an update. Weekly epidemiological record.* 2009;84: 533–540.
18. Constenla DO, Linhares AC, Rheingans RD, Antil LR et al. Economic impact of a rotavirus vaccine in Brazil. *Health Popul Nutr.* 2008;26:388-396.
19. Linhares AC, Verstraeten T, den-Bosch JW, Clemens R et al. Rotavirus serotype G9 is associated with more-severe disease in Latin America. *J Infect Dis.* 2006;43:312-314.
20. Gentsch JR, Woods P, Ramachandran M, 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:S30–S36.

TABLE 1. Clinical severity of rotavirus gastroenteritis according to age, vaccination status and feeding practice among children in Belém, Brazil

Characteristics	Severity score*	β	Standard error	p-value	Odds ratio	95% CI	
						LL	UL
Age at disease	≥ 11 - <15 [§]	-0.3830	0.18	0.04	0.68	0.48	0.97
	≥ 15 [#]	-0,4103	0.24	0.09	0.66	0.41	1.07
Partially vs. fully vaccinated	≥ 11 - <15	0.1271	0.21	0.54	1.14	0.76	1.70
Unvaccinated vs. fully vaccinated	≥ 15	0.3996	0.25	0.11	1.49	0.91	2.45
Breast fed plus vs. breast fed only	≥ 11 - <15	0.3786	0.17	0.02	1.46	1.05	2.03
	≥ 15	0.3994	0.22	0.07	1.49	0.97	2.28
No breast fed vs. Breast fed only	≥ 11 - <15	0.4451	0.70	0.53	1.56	0.40	6.16
	≥ 15	0.2357	0.82	0.77	1.27	0.26	6.28
No breast fed vs. Breast fed only	≥ 11 - <15	0.4342	0.70	0.54	1.54	0.39	6.14
	≥ 15	0.1125	0.82	1.12	1.12	0.22	5.61

* , 20-point, Vesikari score; [§] , Severe episode; [#] , Very severe episode; β , Regression linear coefficient

TABLE2. Proportion of severe rotavirus gastroenteritis cases according to the vaccination status and the intensity of individual symptoms during hospitalization

Characteristics	Categories	Not vaccinated (N = 252)		Partially vaccinated (N = 156)		Fully vaccinated (N = 615)		p-value
		n	%	n	%	n	%	
Number of days of diarrhoea	1-4 days	202	92.2	124	92.5	511	95.5	0.07*
	5 days	9	4.1	9	6.7	17	30.2	
	≥6 days	8	3.6	1	0.7	7	1.3	
Maximum number of looser than normal stools per day	1-3	48	21.8	20	15.0	119	22.5	0.23
	4-5	74	33.6	58	43.6	189	35.7	
	≥6	98	44.5	55	41.4	222	41.9	
Duration of vomiting (days)	1	76	39.2	50	45.9	202	48.3	0.16
	2	55	28.4	28	25.7	117	28.0	
	≥3	63	32.5	31	28.4	99	23.7	
Maximum number of episodes of vomiting per day	1	42	22.0	27	24.8	121	29.5	0.23
	2-4	90	47.1	48	44.0	188	45.8	
	≥5	59	30.9	34	31.2	101	24.6	
Maximum fever reported [measured rectally]	37.1-38.4°C	12	9.2	7	9.7	35	13.3	0.64
	38.5-39.9 °C	69	52.7	42	58.3	137	51.9	
	≥39 °C	50	38.2	23	31.9	92	34.8	
Dehydration	No dehydration	1	0.4	2	1.30	3	0.5	0.64
	Mild/moderate (1-5%)	16	6.5	10	6.5	31	5.1	
	Severe (≥6%)	121	49.0	85	55.2	313	51.7	
Oral rehydration	Yes	67	26.6	36	23.1	130	21.1	0.23*
	No	185	73.4	119	76.3	484	78.7	
	Unknown	0	0.0	1	0.64	1	0.16	
IV rehydration	Yes	251	99.6	156	100	611	99.3	0.84
	No	1	0.4	0	0.0	4	0.7	

N = Number of RV SGE hospitalizations; n = Number of subjects in a given category; % = n/Number of subjects with available results x 100; P-values: Chi-square test to test the association between the vaccination status and the intensity of the symptoms; *P-values: Fisher's Exact test to test the association between the vaccination and intensity of symptoms

TABLE 3. Differences in the duration of general symptoms during hospitalization according to the vaccination status

Symptoms	Parameters	Not vaccinated (0 dose) N = 252	Partially vaccinated (1 dose) N = 156	Fully vaccinated (2 doses) N = 615	p-value
Number of days of fever	n	132	74	264	0.003
	Mean	1.79	1.59	1.50	
	SD	0.99	0.74	0.91	
	Minimum	1.00	1.00	1.00	
	Maximum	6.00	4.00	9.00	
Number of days of diarrhoea	n	219	134	535	0.01
	Mean	2.58	2.40	2.27	
	SD	1.37	1.20	1.19	
	Minimum	1.00	1.00	1.00	
	Maximum	9.00	6.00	8.00	
Duration of vomiting in days	n	194	109	418	0.05
	Mean	2.13	1.96	1.88	
	SD	1.30	1.15	1.10	
	Minimum	1.00	1.00	1.00	
	Maximum	11.00	6.00	6.00	
Number of days of behaviour change before of during hospitalization	n	229	141	548	0.009
	Mean	2.10	2.11	1.92	
	SD	1.04	0.97	0.98	
	Minimum	1.00	1.00	1.00	
	Maximum	6.00	5.00	8.00	
Duration of hospitalization in days	n	253	156	615	0.01
	Mean	5.02	4.88	4.72	
	SD	1.59	1.45	1.39	
	Minimum	2.00	1.00	1.00	
	Maximum	14.00	16.00	16.00	

N = Number of RV SGE hospitalizations; n = Number of subjects in a given category; Q1 = First quartile; Q3 = Third quartile; P-value: Kruskal Wallis test to test the difference between vaccination status and duration; SD = Standard deviation

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As rotaviroses figuram como principal causa de gastroenterite aguda grave e fatal em crianças menores de cinco anos de idade, globalmente (Tate *et al.*, 2012; Fisher Walker *et al.*, 2013). Desde a introdução da VORH no calendário básico de imunizações do Brasil, em 2006, tem se observado considerável impacto na saúde pública, à luz dos resultados de diversos estudos realizados em todo o País, demonstrando redução significativa nas hospitalizações e na mortalidade relacionada às gastroenterites (Linhares e Justino, no prelo).

O presente estudo realizado em Belém, Pará, compreendeu duas etapas: etapa de estudo caso-controle com o objetivo de determinar a efetividade conferida pela VORH (realizado no período de maio de 2008 a maio de 2009, denominado primeiro período); e etapa de monitoramento de amostras circulantes de RVA (no período de maio de 2008 a maio de 2011, denominados segundo e terceiro período, respectivamente)

Na fase caso-controle, realizado entre maio de 2008 e maio de 2009, a proporção de hospitalizações por gastroenterite causada por RVA foi de 19% entre todas as admissões por doença diarreica, denotando um declínio comparativamente às análises realizadas em Belém e em outras regiões do País antes da introdução da vacina VORH (Lanzieri *et al.*, 2010; Sáfadi *et al.*, 2010, Do Carmo *et al.*, 2011). No período que antecedeu o advento da vacina, as admissões hospitalares por RVA eram da ordem de 43% a 46% dentre todas as hospitalizações por diarreia (Munford *et al.*, 2009; Abate *et al.*, 2004), globalmente.

Em relação à distribuição da frequência de gastroenterite causada por RVA por faixa etária, observou-se maior número de casos (53,9%) entre crianças com idade compreendida entre 12 e 23 meses (Artigo I, Justino *et al.*, 2011). É possível que a distribuição quanto à idade e intensidade clínica dos casos de gastroenterite causada por RVA tenham se modificado após a introdução da vacina no calendário nacional de imunizações do mesmo modo como se observou nos Estados Unidos (Tate *et al.*, 2011).

Os resultados da análise de efetividade da VORH (Artigo I, Justino *et al.*, 2011) demonstraram elevada proteção (75%; IC95%: 58,1-86,0) da vacina frente às hospitalizações por gastroenterite causada por RVA, especialmente se considerados os controles domiciliares, naquelas crianças que receberam o esquema completo de vacinação (duas doses), sendo superior à observada entre os controles hospitalares (40.0%; IC95%: 14,2 -58,1).

A duração do efeito protetor conferido por uma vacina representa fator determinante quanto ao seu impacto em saúde pública. Nesse estudo, a proteção determinada pela vacina (efetividade vacinal) entre crianças de 3 a 11 meses de idade foi superior àquela observada nas maiores de um ano utilizando-se controles domiciliares como parâmetro de comparação, sugerindo provável declínio na proteção após um ano de idade. Esse achado também foi observado em outros estudos realizados no Brasil e em países da América Latina (Linhares *et al.*, 2008; De Palma *et al.* 2010; Correia *et al.* 2010).

Embora o impacto da vacina na morbidade tenha sido mais acentuado entre crianças nas faixas etárias elegíveis para a vacinação, um efeito de proteção coletiva pronunciado tornou-se também evidente entre crianças fora dessa faixa etária demonstrado pela nítida redução de casos de gastroenterite causada por RVA entre crianças com abaixo de cinco anos (Lanzieri *et al.*, 2010, 2011; Sáfyadi *et al.*, 2010; Gurgel *et al.*, 2011; Patel *et al.*, 2011).

Uma possível limitação desse estudo consiste na diferença nos resultados de efetividade entre os grupos de controles selecionados, sendo detectada maior efetividade da vacina entre os controles domiciliares se comparados aos controles hospitalares. O fato do protocolo do estudo adotar como critério de exclusão a presença de diarreia nos grupos controles pode ter influenciado nesses resultados. Com efeito, os controles domiciliares possuem a vantagem de minimizar potenciais fatores de interferência que poderiam se refletir no risco quanto ao desenvolvimento dos casos graves de diarreia. Nesse contexto, destacam-se particularmente as condições sócio demográficas e o acesso à vacinação e aos cuidados médicos, fatores sujeitos a ampla variabilidade entre controles hospitalares. Ressalte-se que o presente estudo foi o único no Brasil, até então, a utilizar controles domiciliares para a análise de efetividade da VORH.

Demonstramos que a efetividade da VORH em face de um episódio de gastroenterite por RVA, de acordo com o escore de Ruuska e Vesikari (1990), foi mais acentuada contra os casos classificados clinicamente como graves (escore ≥ 11) e muito graves (≥ 15), comparativamente àqueles com intensidade leve/moderada (1-10), entre as crianças que receberam o esquema completo (duas doses) de imunização. Resultados semelhantes foram encontrados em El-Salvador (De Palma *et al* 2010) e na Bolívia (Patel *et al.*, 2013). Essa maior proteção da vacina frente a casos graves e muito graves da doença revela-se de fundamental importância, especialmente nos países em desenvolvimento nos quais comorbidades associadas como desnutrição, malária, HIV e dificuldades de acesso a atendimento médico podem contribuir para o óbito em quadros clínicos mais graves da doença diarreica.

Ao se comparar a gravidade clínica, utilizando o escore de Ruuska e Vesikari (1990) com a situação vacinal, observou-se que as crianças não vacinadas possuem 1,46 mais chances de apresentar diarreia grave (IC95%: 0,97-2,28; $p=0,02$) comparadas àquelas adequadamente imunizadas (duas doses da VORH). Entretanto, não se observou o mesmo efeito quando se comparou a gravidade clínica daquelas que receberam somente uma dose da vacina àquelas com esquema completo ($p>0,05$).

O escore de Ruuska e Vesikari (1990), consagrado universalmente para avaliação da gravidade clínica da gastroenterite causada por RVA, por vezes revela-se de difícil aplicação frente à necessidade da presença de todos os sintomas de gastroenterite durante o episódio, quais sejam, vômitos, diarreia e febre, para o alcance da pontuação correspondente podendo subestimar a gravidade de um episódio em que predomine o número de vômitos os quais por si só podem levar a quadros de desidratação grave.

Ao longo dos três anos desse estudo, realizamos análise adicional (Artigo III) comparando os sintomas de gastroenterite causada por RVA, isoladamente, frente à situação vacinal quanto a VORH dos participantes da pesquisa; a qual se revela inédita presentemente. O efeito protetor da vacinação foi observado quanto à duração média dos sintomas de febre, vômitos e diarreia frente à permanência hospitalar, comparando-se as crianças não vacinadas àquelas que receberam somente uma dose da VORH e as

que receberam o esquema completo ($p < 0,05$ para todos os sintomas referidos). O mesmo efeito foi observado ao analisar-se o número dos dias de hospitalização e de mudança no estado geral (letargia, irritabilidade) frente ao número de doses de VORH recebidas pela criança ($p < 0,01$ e $p < 0,009$, respectivamente). Os resultados de tais análises denotam relevância principalmente naqueles pacientes com idades inferiores a dois anos cujo estado de desidratação se revela mais acentuado e sujeito a complicações como distúrbios eletrolíticos, acidose metabólica, choque e eventualmente óbito, notadamente nos países em desenvolvimento. Além disso, a menor duração dos sintomas de gastroenterite entre pacientes que receberam o esquema vacinal completo pode incorrer em redução de custos durante a hospitalização refletindo importante ganho para a saúde pública.

Em relação ao monitoramento da circulação das amostras de RVA (Artigo II), observou-se que as infecções pelo genótipo G2P[4] se mostraram predominantes (82%) no primeiro período do estudo (maio de 2008 a maio de 2009). Diversos outros estudos realizados em várias regiões do País, pós-introdução da VORH, demonstraram que a circulação do G2P[4] variou entre 41% a 96% (Correa *et al.*, 2010; Gurgel *et al.*, 2009; Carvalho-Costa *et al.*, 2009; Sáfadi *et al.*, 2010; Dulgheroff *et al.*, 2013). A propósito, registre-se a aparente re-emergência do genótipo G2P[4] também observada em diferentes estudos na América Latina, Europa, Ásia, África e Austrália. (Kirkwood *et al.*, 2008; Leite *et al.*, 2008; Nakagomi *et al.*, 2008; Munford *et al.*, 2009; Antunes *et al.*, 2009; Gurgel *et al.*, 2009; Carvalho-Costa *et al.*, 2009; Dey *et al.*, 2009; Hasing *et al.*, 2009; Sáfadi *et al.*, 2010; O’Ryan *et al.*, 2011).

Tal fato suscitou a hipótese de que a introdução da vacina monovalente VORH em larga escala, contendo o genótipo G1P[8] atenuado, teoricamente exerceria pressão seletiva na circulação de tipos de RVA, ensejando a predominância de uma amostra geneticamente distinta, qual seja a G2P[4] (Gurgel *et al.*, 2009; Nakagomi *et al.*, 2008).

No entanto, em países da América Latina onde a vacina utilizada no programa nacional de imunizações é a pentavalente (Rotateq®), também se observou predomínio do tipo G2P[4]; como na Nicarágua, esse genótipo foi detectado em 88% dos casos entre 2007-2008 (Patel *et al.*, 2009). Na Argentina, onde não se utiliza até então vacina contra RVA, Esteban *et al.* (2010) também detectaram o predomínio de circulação do

genótipo G2P[4] nos anos de 2004 e 2007 (43.9% e 57.5%, respectivamente). Tais achados sustentam a hipótese de que o genótipo predominante em regiões distintas ocorra independentemente da vacina em uso, e reforçam o caráter natural da flutuação ao longo do tempo dos genótipos circulantes (Santos e Hoshino, 2005).

A efetividade da vacina frente a um tipo de RVA completamente distinto da composição vacinal monovalente (G1P[8]) reserva particular interesse. Apesar dos novos genótipos representarem um novo desafio à vacina monovalente, a evidencia da sua capacidade de conferir imunidade cruzada contra outros genótipos (proteção heterotípica) já havia sido demonstrada nos ensaios clínicos de fase II e III realizados em diversos países do mundo, inclusive no Brasil (Ruiz-Palacios *et al.*, 2006; Vesikari *et al.*, 2007; Linhares *et al.*, 2008; Justino *et al.*, 2012).

No segundo e terceiro anos da fase de vigilância das amostras circulantes, mais objetivamente a partir de 2010 (Artigo II), os dados de genotipagem configuraram expressiva mudança quanto aos tipos virais detectados, revelando incremento progressivo na frequência do genótipo G1P[8] em Belém, comparativamente ao que ocorreu na fase de estudo caso-controle, quando o G2P[4] dominava o cenário. O declínio observado na circulação do genótipo G2P[4] mantém a hipótese de simples flutuação natural dessas amostras virais, mostrando-se compatível a diversos estudos publicados no Brasil, América Latina, Europa e Austrália (Leite *et al.*, 2008; Carvalho-Costa *et al.*, 2009, 2011; Sáfadi *et al.*, 2010; Zeller *et al.*, 2010; Braeckman *et al.*, 2011; Oliveira *et al.*, 2012; Dulgheroff *et al.*, 2012). Não obstante tais achados, cabe considerar também a possibilidade do declínio do genótipo G2P[4] ser decorrente da imunidade homotípica cumulativa adquirida entre as crianças menores de cinco anos de idade, faixa etária elegível para recrutamento no estudo em Belém.

Ressalte-se ainda o marcante incremento na detecção dos padrões genotípicos mistos de RVA, se consideradas as especificidades G e P, observado ao longo do segundo e terceiro anos de vigilância. Essa elevada proporção de infecções mistas tem sido relatada com frequência nos países menos desenvolvidos, com o potencial de ampliar a diversidade, à custa de rearranjos genéticos e outros mecanismos; portanto, representam desafios em potencial à efetividade da vacina sob uso (Santos e Hoshino, 2005; Gentsch *et al.*, 1996, 2005; O’Ryan *et al.*, 2011). Também se mostraram

frequentes ao longo dos dois últimos anos de monitoramento (2010 e 2011), amostras nas quais não se definiram as especificidades genótípicas, particularmente aquelas inerentes à proteína VP7, não raro associadas aos tipos P[6] e P[8]. Como por razões de protocolo não pesquisamos especificamente o genótipo G12, cuja expansão global se observa claramente há alguns anos, entende-se como plausível admitir que vários dos RVA circulantes em Belém comportassem essa especificidade (Matthijnssens *et al.*, 2010; Soares *et al.*, 2010, Linhares e Justino, *no prelo*).

O presente estudo contribuiu para um maior conhecimento acerca da eficácia da VORH em uma região com um dos menores Índices de Desenvolvimento Humano (IDH) no Brasil (0,76), além de permitir avaliar sua proteção em um cenário de circulação de genótipos de RVA completamente distinto daquele existente por ocasião dos ensaios clínicos com essa vacina, também conduzidos em Belém, Pará.

Apesar de ter sido postulada imunidade menos duradoura da VORH entre crianças maiores de um ano de idade, novos estudos são absolutamente necessários, objetivando-se análise mais abrangente e representativa sobre a duração da eficácia conferida pelo imunizante em questão.

As controvérsias que ainda cercam a questão dos tipos circulantes num contexto de pós-introdução da vacina contra RVA, justificam plenamente a manutenção contínua da vigilância dos genótipos circulantes. Tal monitoramento ininterrupto e sistemático, eventualmente elucidará o perfil dos genótipos predominantes ao longo do tempo, bem como a eventual emergência de amostras que possam representar desafio às estratégias vigentes de vacinação no Brasil e em outros países.

Cabe ressaltar que, a despeito do tipo viral predominante, ambas as vacinas licenciadas até o momento (Rotarix® e Rotateq®) demonstram importante impacto na redução da morbidade e mortalidade associadas à gastroenterites graves em geral e as causadas por RVA entre crianças menores de cinco anos de idade, em caráter global.

Embora a ampliação do limite etário para a administração da segunda dose da VORH no Brasil provavelmente se traduza em mais benefícios para a saúde pública, como decorrência da vacinação contra os RVA, entende-se como crucial manter uma

vigilância contínua para os potenciais riscos de intussuscepção num cenário mais flexível quanto à restrição de idade. Ressalte-se que apesar do aparente e discreto incremento da intussuscepção após a segunda dose, os benefícios decorrentes da proteção conferida por essas vacinas suplantam amplamente eventuais riscos.

8. CONCLUSÕES

Demonstrou-se expressiva efetividade (75,8%; IC95%: 58,1–86,0) da vacinação completa (duas doses) com VORH na prevenção da gastroenterite grave por RVA entre crianças nascidas após 6 de março de 2006 e que têm pelo menos 12 semanas de idade, hospitalizadas em quatro clínicas/hospitais na área de Belém.

Foi observada boa efetividade da VORH também naqueles pacientes que haviam recebido esquema vacinal incompleto (88,9%; IC95%: 63.4–96.6).

Houve considerável redução na proporção de hospitalizações por gastroenterite e também naquelas causadas por RVA, em Belém, Pará, após o uso em larga escala da vacina VORH.

A faixa etária mais frequente dentre as admissões por gastroenterite grave causada por RVA foi entre 12 e 23 meses de idade. O período de maior número de hospitalizações ocorreu nos meses de julho e agosto em todo o período estudado.

Houve predomínio do genótipo G2P[4] nos primeiros 20 meses da pesquisa, entretanto observou-se declínio desse tipo viral nos meses seguintes, nos quais se notou ascensão do genótipo G1P[8] e de padrões mistos, refletindo uma aparente flutuação natural dessas cepas virais ao longo do tempo, não sugerindo associação com a VORH utilizada em larga escala no Brasil.

Em relação à intensidade clínica da gastroenterite causada por RVA em crianças com o esquema vacinal completo (duas doses), observou-se boa efetividade especialmente naquelas com intensidade clínica grave (78,8%; IC95%: 52.1–90.6) e muito grave (90%; IC95%: 21.9– 98.7) de acordo com o escore de Ruuska & Vesikari.

A duração dos sintomas de gastroenterite e o tempo de hospitalização foi menor entre as crianças que haviam recebido esquema completo (duas doses) da VORH em relação àqueles não imunizados.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abate H, Linhares AC, Venegas G, Vergara R, Lopez P, Jimenez E. A multi-center study of intussusception in Latin America: first year results. Abstract: International Congress of Pediatrics. 2004; August 15-20, Cancún, Mexico.

Ahmed K, Bozdayi G, Mitui MT, Ahmed S, Kabir L, Buket D et al. Circulating rotaviral RNA in children with rotavirus antigenemia. *J Negat Results Biomed.* 2013; 12:5.

Anderson, EJ; Weber, SG. Rotavirus infection in adults. *Lancet Infect Dis.* 2004; 4: 91-99.

Angel J, Franco MA, Greenberg HB. Rotavirus vaccines: recent developments and future considerations. *Nature Reviews/Microbiology* 2007 Jul; 5: 529-39.

Angel J, Franco MA, Greenberg HB. Rotavirus immune responses and correlates of protection. *Curr Opin Virol.* 2012; 2 (4): 419-425.

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: 76-78.

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

Araujo EC, Clemens SAC, Oliveira CS, Justino MCA, Rubio P, Gabbay YB et al. Segurança, imunogenicidade e eficácia protetora de duas doses da vacina RIX4414 contendo rotavírus atenuado de origem humana. *J Pediatr (Rio J).* 2007; 83 (3): 217-224.

Armah GE, Sow SO, Breiman RF, Dallas MJ, Tapia MD, Feikin DR et al. Efficacy of pentavalent rotavirus vaccine against severe rotavirus gastroenteritis in infants in developing countries in sub-Saharan Africa: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet.* 2010; 376(9741): 606-614.

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

Bányai K, László B, Duque J, Steele AD, Nelson EAS, Gentsch JR, Parashar UD. Systematic review of regional and temporal trends in global rotavirus strain diversity in the pre rotavirus vaccine era: insights for understanding the impact of rotavirus vaccination programs. *Vaccine.* 2012; (Suppl 30): 122-130.

Barro M, Patton JT. Rotavirus NSP1 inhibits expression of type I interferon by antagonizing the function of interferon regulatory factors IRF3, IRF5 and IRF7. *J Virol.* 2007; 81 (9): 4473-4481.

Bentama I, Soussi I, Ghanimi Z, Riane S, Tligui H, Mdaghri Alaqui A, Thimou Izgua A. Epidemic of nosocomial infection by rotavirus in a neonatology service. *Rev Med*

Brux. 2012; 33 (6): 519-524.

Bernstein DI, Sander DS, Smith VE, Schiff GM, Ward RL, 1991. Protection from rotavirus infection: 2-year prospective study. *J. Infect. Dis.*, 164: 277-283.

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

Bertolotti-Ciarlet A, Ciarlet M, Crawford SE, Conner MD, Estes MK. Immunogenicity and protective efficacy of rotavirus 2/6-virus-like particles produced by a dual baculovirus expression vector and administered intramuscularly, intranasally, or orally to mice. *Vaccine.* 2013; 21: 3885-3900.

Bishop RF, Davidson GP, Holmes IH, Ruck BJ. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with viral gastroenteritis. *The Lancet.* 1973; 2: 1281-1283.

Blutt SE, Kirwood CD, Parreño V, Warfield KL, Ciarlet M, Estes MK, Bok K, Bishop RF, Conner ME. Rotavirus antigenemia and viraemia: a common event? *The Lancet.* 2003; 362: 1445-1449.

Blutt SE, Matson DO, Crawford SE, Staat MA, Azimi P, Bennett BL et al. Rotavirus antigenemia in children is associated with viremia. *Plos Medicine.* 2007; 4: 660-668.

Boom JA, Tate JE, Sahni LC, Rench MA, Hull JJ, Gentsch JR et al. *Pediatrics.* 2010; 125: e199-207.

Borade A, Bais AS, Bapat V, Dhongade R. Characteristics of rotavirus gastroenteritis in hospitalized children in Pune. *Indian J Med Sci.* 2010; 64 (5): 210-218.

Borges AM, Dias e Souza M, Fiaccadori FS, Cardoso Dd. Monitoring the circulation of rotavirus among children after the introduction of the Rotarix™ vaccine in Goiânia, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2011; 106 (4): 499-501.

Braeckman T, Van Herck K, Raes M, Vergison A, Sabbe M, Van Damme P. Rotavirus vaccines in Belgium: policy and impact. *Pediatr Infect Dis J.* 2011; 30(1 Suppl): S21-4.

Braeckman T, Van Herck K, Meyer N, Pirçon JY, Soriano-Gabarró M, Heylen E et al. Effectiveness of rotavirus vaccination in prevention of hospital admissions for rotavirus gastroenteritis among young children in Belgium: case-control study. *BMJ.* 2012; 345: e4752.

Brandt CD, Arndt CW, Evans GL, Kim HW, Stallings EP, Rodriguez WJ, Parrott RH. Evaluation of a latex test for rotavirus detection. *J. Clin. Microbiol.* 1987; 25: 1800-1802.

Bricks LF. Rotavírus: atualização sobre doenças e vacinas. *Pediatria (São Paulo).* 2005; 27 (4): 252-266.

Brunet JP, Cotte-Laffitte J, Linxe C; Quero A.M; Geniteau-Legendre M, Servin A. Rotavirus infection induces an increase in intracellular calcium concentration in human intestinal epithelial cells: role in microvillar actin alteration. *J Virol.* 2000; 74 (5): 2323-2332.

Buttery JP, Lambert SB, Grimwood K, Nissen MD, Field EJ, Macartney KK et al.

Reduction in rotavirus-associated acute gastroenteritis following introduction of rotavirus vaccine into Australia's National Childhood vaccine schedule. *Pediatr Infect Dis J.* 2011; 30(Suppl 1): S25-29.

Cancho- Candela R, Peña-Valenceja A, Alcade-Martin C, Ayuso-Fernandez M, Medrano-Sánchez O, Ochoa-Sangrador C. Benign convulsions with mild rotavirus gastroenteritis. *Ver Neurol.* 2009; 49 (5): 230-233.

Candeias JA, Rosemberg CP, Rácz ML. Identificação por contra-imunoeletroforese de rotavírus em casos de diarreia infantil. *Rev. Saúde Públ.* 1978; 12: 99-103.

Carvalho-Costa FA, Araújo IT, Santos de Assis RM, Fialho AM, de Assis Martins CM, Bóia MN et al. Rotavirus genotyping distribution after vaccine introduction, Rio de Janeiro, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2009; 15: 95-97.

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

Carmo GMI, Yen C, Cortes J, Siqueira AA, Oliveira WK, Cortez-Escalante JJ et al. Decline in diarrhea mortality and admissions after routine childhood rotavirus immunization in Brazil: a time-series analysis. *PLoS Medicine.* 2011; 8(4): e1001024.

CDC (Centers for Disease Control and Prevention), 1999. Withdrawal of rotavirus vaccine recommendation. *MMWR*, 48: 1007.

CDC (Centers for Disease Control and Prevention). Delayed onset and diminished magnitude of rotavirus activity, United States, November 2007-May 2008. *MMWR-Morb Mortal Wkly Rep.* 2008; 57(25): 697-700.

CDC (Centers for Disease Control and Prevention). Prevention of rotavirus gastroenteritis among infants and children. Recommendations of the Advisory Committee on immunization Practices (ACIP). *Morb Mortal Wkly Rep.* 2009; 58.

Centenari C, Gurgel RQ, Bohland AK, Oliveira DM, Faragher B, Cuevas LE. Rotavirus vaccination in northeast Brazil: a laudable intervention, but can it lead to cost-savings? *Vaccine.* 2010; 28 (25): 4162-4168.

Chen Sc, Tan LB, Huang LM, Chen KT. Rotavirus infection and the current status of rotavirus vaccines. *J Formos Med Assoc.* 2012; 111(4): 183-193.

Chevart B, Friedland LR, Abu-Elyazeed R, Han HH, Guerra Y, Verstraeten T. *Pediatr Infect Dis J.* 2009; 28 (3): E1-E8.

Chitambar SD, Tatte VS, Dhongde R, Kalrao V. High frequency of rotavirus viremia in children with acute gastroenteritis: discordance os strains detected in stool and sera. *J. Med. Virol.* 2008; 80: 2169-2176.

Christy C, Madore HP, Pichichero ME, Gala C, Pincus P, Vosefski D, Hoshino Y, Kapikian A, Dolin R, 1988. Field trial of rhesus rotavirus vaccine in infants. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 1988, 7: 645-650.

Ciarlet M, Sani-Grosso R, Yuan G, Liu GF, Heaton PM, Gottesdiener KM et al.

Concomitant use of the oral pentavalent human-bovine reassortant rotavirus vaccine and oral poliovirus vaccine. *Pediatr Infect Dis J.* 2008; 27(10): 874-880.

Cilli A, Luchs A, Morillo SG, Costa FF, Carmona RCC, Timenetsky MCST. Characterization of rotavirus and norovirus strains: a 6-year study (2004-2009). *J Pediatr (Rio J).* 2011; 87(5): 445-449.

Coiro JRL, Bendati MMA, Almeida-Neto AJ, Heuser MCL, Vasconcelos VL. Rotavirus infection in Brazilian children with acute gastroenteritis: a seasonal variation study. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1983; 32: 1186-1188.

Constenla DO, Linhares AC, Rheingans RD, Antil LR, Waldman EA, da Silva LJ. Economic impact of a rotavirus vaccine in Brazil. *J. Health Popul. Nutr.* 2008; 26: 388-396.

Cook SM, Glass RI, LeBaron CW, Ho MS, 1990. Global seasonality of rotavirus infections. *Bull World Health Organ.* 1990; 68(2): 171-177.

Correia JB, Patel MM, Nakagomi O, Montenegro FM, Germano EM, Correia NB, Cuevas LE, Parashar UD, Cunliffe NA, Nakagomi T. Effectiveness of monovalent rotavirus vaccine (Rotarix) against severe diarrhoea caused by serotypically-unrelated G2P[4] strains in Brazil. *J Infect Dis.* 2010; 201: 363-369.

Cortese MM, Tate JE, Simonsen L, Edelman L, Parashar UD. Reduction in gastroenteritis in children and correlation with early rotavirus vaccine uptake from a national medical claims database. *Pediatr Infect. Dis. J.* 2010. *In press.*

Crawford SE, Estes MK, Ciarlet M, Barone C, O'Neal CM, Cohen, J et al. Heterotypic protection and induction of a broad heterotypic neutralization response by rotavirus-like particles. *J Virol.* 1999; 73(6): 4813-4822.

Crawford SE; Patel DG; Cheng E; Berkova Z; Hyser JM; Ciarlet M. et al. Rotavirus viremia and extraintestinal viral infection in the neonatal rat. *Model j virol.* 2006; 80(10): 4820-4832.

Cunliffe NA, Kilgore PE, Bresee JS, Steele AD, Luo N, Hart CA, Glass RI. Epidemiology of rotavirus diarrhoea in Africa: a review to assess the need for rotavirus immunization. *Bull. World Health Organ.* 1998; 76: 886-904.

Cunliffe NA, Gondwe JS, Kirkwood CD, Graham SM, Nhlane NM, Thindwa BD et al. Effect of concomitant HIV infection on presentation and outcome of rotavirus gastroenteritis in Malawian children. *Lancet.* 2001; 358 (9281):550-555.

Cunliffe NA, Bresee JS, Hart CA. Rotavirus vaccines: development, current issues and future prospects. *J. Infect.* 2002; 45: 1-9.

Danchin M, Kirkwood CD, Lee KJ, Bishop RF, Watts E, Justice FA et al. Phase I trial of RV3-BB rotavirus vaccine: a human neonatal rotavirus vaccine. *Vaccine.* 2013; 31(23): 2610-2616.

Dang DA, Nguyen VT, Vu DT, Nguyen TH, Nguyen DM, Yuhuan W et al. A dose-escalation safety and immunogenicity study of a new live attenuated human rotavirus vaccine (Rotavin-M1) in Vietnamese children. *Vaccine.* 2012; 30 Suppl 1: A114-121.

Das SK; Gentsch JR; Cicirello HG; Woods PA; Gupta A; Ramachandran M et al. Characterization of rotavirus strains from newborns in New Delhi, India. *J Clin Microbiol.* 1994; 32(7):1820-1822.

Das SK; Faruque AS; Chisti MJ; Malek AM; Salam MA; Sack DA. Changing trend of persistent diarrhoea in young children over two decades: observations from a large diarrhoeal disease hospital in Bangladesh. *Acta Paediatr.* 2012; 101(10): 452-457.

Davidson GP; Bishop RF; Townley RR; Holmes IH. Importance of a new virus in acute sporadic enteritis in children. *Lancet.* 1975; 1 (7901): 242-246.

Dennehy PH. Rotavirus vaccines: An Update. *The Pediatric Infectious Disease Journal.* 2007; 25: 839-840.

Dennehy PH. Rotavirus Vaccines: an Overview. *Clin Microbiol Rev.* 2008; 21 (1): 98-208.

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

Desai R, Oliveira LH, Parashar UD, Lopman B, Tate JE, Patel MM. Reduction in morbidity and mortality from childhood diarrhoeal disease after species A rotavirus vaccine introduction in Latin America - a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2011; 106 (8): 907-911.

Desselberger U, Flewett TH. Clinical and public health virology: a continuous task of changing pattern. In: Melnick JL (ed.). *Progress in Medical Virology*, S. Karger, Basel, Switzerland, 1993; 48-81.

Desselberger U, Huppertz H. Immune Responses to Rotavirus Infection and Vaccination and Associated Correlates of Protection. *The Journal of Infectious Diseases.* 2011; 203:188-195.

De Palma O, Cruz L, Ramos H, de Baires A, Villatoro N, Pastor D, de Oliveira LH et al. Effectiveness of rotavirus vaccination against childhood diarrhoea in El Salvador: case-control study. *BMJ.* 2010; 340.c2825.

De Villiers FP; Drissen M. Clinical neonatal rotavirus infection: association with necrotising enterocolitis. *S Afr Med J.* 2012; 102 (7): 620-624.

Dey SK, Hayakawa Y, Rahman M, Islam R, Mizuguchi M, Okitsu S, Ushijima H. G2 strain of rotavirus among infants and children, Bangladesh. *Emerg Infect Dis.* 2009; 15 (1): 91-94.

Dickey M, Jamison L, Michaud L, Care M, Bernstein DI, Staat MA. Rotavirus meningoencephalitis in a previously healthy child and a review of the literature. *Pediatr Infect Dis J.* 2009; 28 (4): 318-321.

do Carmo GM, Yen C, Cortes J, Siqueira AA, de Oliveira WK, Cortez-Escalante JJ et al. Decline in diarrhea mortality and admissions after routine childhood rotavirus immunization in Brazil: a time-series analysis. *PLoS Med.* 8(4):e1001024.

Dulgheroff AC, Figueiredo EF, Moreira LP, Moreira KC, Moura LM, Gouvêa VS, Domingues AL. Distribution of rotavirus genotypes after vaccine introduction in the

Triângulo Mineiro region of Brazil: 4-Year follow-up study. *J. Clin. Virol.* 2013; 55 (1), 67-71.

Esteban LE, Rota RP, Gentsch JR, Jiang B, Esona M, Glass RI et al. Molecular epidemiology of group A rotavirus in Buenos Aires, Argentina 2004-2007: reemergence of G2P[4] and emergence of G9P[8] strains. *J Med Virol.* 2010; 82 (6): 1083-1093.

Estes MK, Kapikian AZ. Rotaviruses. In: Knipe DM and Howley PM, editors. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincot Williams & Wilkins; 2007. 1917-1974.

Faure, C. Role of antidiarrhoeal drugs as adjunctive therapies for acute diarrhea in children. *Int J Pediatr.* 2013; ID 612403: 14 pages available on: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/612403>.

Fisher TK, Steinsland H, Valentiner-Branth P. Rotavirus particles can survive in ambient tropical temperatures for more than 2 months. *J Clin Microbiol.* 2002; 40 (12): 4763-4764.

Fisher TK, Bresee JS, Glass RI. Rotavirus vaccine and the prevention of hospital-acquired diarrhea in children. *Vaccine.* 2004; Suppl 1: S49-54.

Fisher TK, Ashley D, Kerin T, Reynolds-Hedmann E, Gentsch J, Widdowson MA et al. Rotavirus antigenemia in patients with acute gastroenteritis. *J Infect Dis.* 2005; 192 (5): 913-919.

Flannery B, Samad S, de Moraes JC, Tate JE, Danovaro-Holliday MC, de Oliveira LH, Rainey JJ. Uptake of oral rotavirus vaccine and timeliness of routine immunization in Brazil's National Immunization Program. *Vaccine.* 2013; 31(11): 1523-1528.

Flewett TH, Bryden AS, Davies H. Letter: Virus particles in gastroenteritis. *Lancet.* 1973; 29 (2): 1497.

Fu C, Wang M, Liang J, He T, Wang D, Xu J, 2007. Effectiveness of Lanzhou lamb rotavirus vaccine against rotavirus gastroenteritis requiring hospitalization: a matched case-control study. *Vaccine*, 25: 8756-8761.

Fujita Y, Liu B, Kohira R, Mugishima H, Izumi H, Kuzuya M et al. Rotavirus antigenemia and genomia in children with rotavirus gastroenteritis. *Jpn J Infect Dis.* 2010; 63(2): 83-86.

García-Díaz A, López-Andújar P, Rodríguez Díaz J, Montava R, Torres Barceló C, Ribes JM, Buesa J. Nasal immunization of mice with a rotavirus DNA vaccine that induces protective intestinal IgA antibodies. *Vaccine.* 2004; 23 (4): 489-498.

Gentsch JR, Glass RI, Woods P, Gouvea V, Gorziglia M, Flores J et al. Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1992; 30(6): 1365-1373.

Greenberg HB, Estes MK. Rotaviruses: from pathogenesis to vaccination. *Gastroenterology.* 2009. 136: 1939-1951.

Giaquinto C, Van Damme P, Huet F, Gothefors L, Maxwell M, Todd P, Dalt T, REVEAL study group. Clinical consequences of rotavirus acute gastroenteritis in

- Europe.2004-2005: the REVEAL study. *J Infect Dis.* 2007; Suppl 1: S26-35.
- Giordano S, Serra G, Dones P, Di Gangi M, Failla MC, Iaria C, Ricciardi F et al. Acute pancreatitis in children and rotavirus infection. Description of a case and minireview. *New Microbiol.* 2013; 36(1): 97-101.
- Girard MP, Steele D, Chaignat CL, Kieny MP. A review of vaccine research and development: human enteric infections. *Vaccine.* 2006; 24 (15): 2732-2750.
- Grandy G, Medina M, Soria R, Téran CG, Araya M. Probiotics in the treatment of acute rotavirus diarrhoea. A randomized, double-blind, controlled trial using two different probiotic preparations in Bolivian children. *BMC Infectious Diseases.* 2010; 10: 253.
- Gray J, Vesikari T, Van Damme P, Giaquinto C, Mrukowicz J, Guarino et al. Rotavirus. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 2008; 46 (Suppl 2): S24-31.
- Greenberg HB, Estes MK. Rotaviruses: from pathogenesis to vaccination. *Gastroenterology.* 2009; 136: 1939-1951.
- Gurgel RG, Bohland AK, Vieira SC, Oliveira DM, Fontes PB, Barros VF et al. Incidence of rotavirus and all-cause diarrhea in northeast Brazil following the introduction of a national vaccination program. *Gastroenterology.* 2009; 137(6): 1970-1975.
- Gurgel RQ, Cuevas LE, Vieira SC, Barros VC, Fontes PB, Salustino EF, Nakagomi O, et al. Predominance of rotavirus P[4]G2 in a vaccinated population, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2007; 13 (10): 1571-1573.
- Gurgel RQ, Ilozue C, Correia JB, Centenari C, Oliveira SM, Cuevas LE. Impact of rotavirus vaccination on diarrhoea mortality and hospital admissions in Brazil. *Trop Med Int Health.* 2011; 16(9): 1180-1184.
- Gusmão RHP; Mascarenhas JDP; Gabbay YB; Lins-Lainson Z; Ramos FLP; Monteiro TAF; Valente AS; Linhares AC. Rotaviruses as a cause of nosocomial, infantile diarrhoea in Northern Brazil: pilot study. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 1995; 90: 743-749.
- Hasing ME, Trueba G, Baquero MI, Ponce K, Cevallos W, Solberg OD et al. Rapid changes in rotaviral genotypes in Ecuador. *J Med Virol.* 2009; 81: 2109-2113.
- Herring AJ, Inglis NF, Ojeh CK, Snodgrass D, Menzies JD. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. *J. Clin. Microbiol.* 1982; 16: 473-477.
- Hjelt K, Paerregaard A, Petersen W, Christiansen L, Krasilnikoff PA. Rapid versus gradual refeeding in acute gastroenteritis in childhood: energy intake and weight gain. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 1987; 8: 75-80.
- Hung JJ, Wen HY, Yen MH, Chen HW, Yan DC, Lin KL et al. Chang Gung Med Rotavirus gastroenteritis associated with afebrile convulsion in children: clinical analysis of 40 cases. *Chang Gung Med J.* 2003; 26 (9): 654-659.
- Hyser JM, Estes MK. Rotavirus Vaccines and Pathogenesis. *Curr Opin Gastroenterol.* 2009; 25 (1): 36-43.

Iturriza-Gomarra M, Anderton E, Kang G, Gallimore C, Phillips W, Desselberger U, Gray J. Evidence for genetic linkage between the gene segments encoding NSP4 e VP6 proteins in common and reassortant human rotavirus strains. *Journal of Clinical Microbiology*. 2003; 3566-3573.

Jiang B, Gentsch JR, Glass RI. The role of serum antibodies in the protection against rotavirus disease: an overview. *Clin. Infect. Dis*. 2002; 34: 1351-1361.

Jiang B, Gentsch JR, Glass RI. Inactivated rotavirus vaccines: a priority for accelerated vaccine development. *Vaccine*. 2008; 26 (52): 6754-6758.

Johansen K, Hedlund KO, Zwegberg-Wirgart B, Bennet R. Complications attributable to rotavirus-induced diarrhea in a Swedish paediatric population: report from 11-year surveillance. *Scand J Infect Dis*. 2008; 40 (11-12): 958-964.

Justino MCA, Araújo EC, Doorn LJ, Oliveira CS, Gabbay YB, Mascarenhas JDP et al. Oral live attenuated human rotavirus vaccine (Rotarix™) offers sustained high protection against severe G9P[8] rotavirus gastroenteritis during the first two years of life in Brazilian children. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012; 107(7): 846-853.

Justino MCA, Abreu E, Linhares AC, Soares S, Soares T, Fumian T et al. Rotavirus antigenaemia in children hospitalised for acute gastroenteritis in Belém, Brazil. Trabalho apresentado no XV Congresso Latino-Americano de Infectologia Pediátrica – SLIPE 2013; 2013 jun 25-29; São Paulo, Brasil.

Kaiser P, Borte M, Zimmer KP, Huppertz HI. Complications in hospitalized children with acute gastroenteritis caused by rotavirus: a retrospective analysis. *Eur J Pediatr*. 2012; 171 (2): 337-344.

Kang G, Arora R, Chitambar SD, Deshpande J, Gupte MD, Kulkarni M, Naik TN, et al. Multicenter, hospital-based surveillance of rotavirus disease and strains among Indian children aged <5 years old. *JID*. 2009 (Suppl 1): S147-S153.

Kapikian AZ, Hoshino Y, Chanock RM. Rotaviruses. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Martin MA, Lamb RA, Roizman B, Strauss SE, editors. *Fields virology*, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa. 2001. p. 1787-1833.

Kirkwood CD, Cannan D, Boniface K, Bishop RF, Barnes GL. Australian rotavirus surveillance group. Australian Rotavirus Surveillance Program annual report, 2007/2008. *Commun Dis Intell*. 2008; 32: 425-429.

Kirkwood CD, Roczo S, Boniface K, Bishop RF, Barnes GL. Australian Rotavirus Surveillance Group. Australian Rotavirus Surveillance Program annual report, 2010/11. *Commun Dis Intell Q Rep*. 2011; 35(4): 281-287.

Kotloff KL, Nataro JP, Blackwelder WC, Nasrin D, Farag TH, Panchalingam S et al. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. *Lancet*. 2013; 382 (9888): 209-222.

Kumagai H, Matsumoto S, Ebashi M, Ohson T. Acute pancreatitis associated with rotavirus infection. *Ind. Pediatr*. 2009; 46: 1099-1101.

Lanzieri TM, Costa I, Shafi FA, Cunha MH, Ortega-Barria E, Linhares AC, Colindres RE. Trends in hospitalizations from all-cause gastroenteritis in children <5 years of age in Brazil before and after human rotavirus vaccine introduction, 1998-2007. *Pediatr Infect Dis J.* 2010; 29: 673-675.

Lanzieri TM; Linhares AC; Costa I; Kolhe DA; Cunha MH; Ortega-Barria E; Colindres RE. Impact of rotavirus vaccination on childhood deaths from diarrhea in Brazil. *Int J Infect Dis.* 2011 Mar;15(3):e206-10.

LeBaron CW; Lew J; Glass RI; Weber JM; Ruiz-Palacios GM. The Rotavirus Study Group. Annual rotavirus epidemic patterns in North America: results of a five-year retrospective survey of 88 centers in Canada, Mexico, and the United States. *JAMA.* 1990; 264: 983-988.

Leite JPG; Carvalho-Costa FA; Linhares AC. Group A rotavirus genotypes and the ongoing Brazilian experience: a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2008; 103: 745-753.

Le Saux N, Bettinger JA, Halperin SA, Vaudry W, Scheifele DW. Substantial morbidity for hospitalized children with community-acquired rotavirus infections: 2005-2007 impact surveillance in canadian hospitals. *Pediatr Infect Dis J.* 2010; 29 (9): 879-882.

Linhares AC, Pinheiro FP, Schmetz C, Muller G, Peters D. Duovírus (rotavírus) em Belém, Pará (nota prévia). *Rev. Inst. Med. Trop.* 1977; 19: 278-279.

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: 129-145.

Linhares AC, Ruiz-Palacios GM, Guerrero ML, Salinas B, Pérez-Schael I, Costa Clemens AS et al. A short report on highlights of world-wide development of RIX4414: a Latin American experience. *Vaccine.* 2006; 24(18): 3784-3785

Linhares AC, Velázquez FR, Pérez-Schael I, Sáez-Llorens X, Abate H, Espinoza F, et al. Efficacy and safety of an oral live attenuated human rotavirus vaccine against rotavirus gastroenteritis during the first 2 years of life in Latin American infants: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase III study. *Lancet.* 2008; 371: 1181–1189.

Linhares AC, Gabbay YB, Mascarenhas JDP, Oliveira CS, Justino MCA. Gastroenterites por rotavírus. *Gastroenterites por rotavírus.* In: *Tratado de Infectologia.* Veronesi-Focaccia; 4. ed. Rio de Janeiro: Editora: Guanabara-Koogan; 2010. v. 1, p. 465-484.

Linhares AC, Justino MCA, Lanzieri T, Miranda Y, Mascarenhas JDP, Abreu E, Guerra S et al. Effectiveness of the human rotavirus vaccine against hospitalization for severe rotavirus gastroenteritis in Belém, Brazil. *Annual Meeting of the European Society for Paediatric Infectious Diseases, Abstract:* 2010; May 4-8, Nice, France.

Linhares AC, Justino MCA. Vacinas contra o rotavírus: um grande impacto na saúde pública, seis anos pós-licenciatura. *Rev Pan-Amaz Saude.* 2011; editorial, (2) 2.

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

Liu B, Fujita Y, Arakawa C, Kohira R, Fuchigami T, Mugishima H, Kuzuya M. Detection of rotavirus RNA and antigens in serum and cerebrospinal fluid samples from diarrheic children with seizures. *Jpn J Infect Dis*. 2009; 62: 279-283.

López S, Arias CF. Multistep entry of rotavirus into cells: a Versaillesque dance. *Trends Microbiol*. 2004; 12: 271-278.

López P, Linhares AC, Pérez-Schael I et al. Early protection against severe rotavirus gastroenteritis - RIX4414 experience in Latin America. 24th Annual Meeting of the European Society for Paediatric Infectious Diseases (ESPID) 2006 May 3-5; Basel, Switzerland. Abstract 462.

Lopman BA, Payne DC, Tate JE, Patel MM, Cortese MM, Parashar UD. Post-licensure experience with rotavirus vaccination in high and middle income countries; 2006 to 2011. *Curr Opin Virol*. 2012; 2 (4): 434-442.

Lynch M, Lee B, Azimi P, Gentsch J, Glaser C, Gillian S, Chang H-GH, Ward R, Glass RI. Rotavirus and central nervous system symptoms: cause or contaminant? Case reports and review. *Clin. Infect. Dis*. 2001; 7: 932-938.

Luchs A, Morillo SG, Ribeiro CD, Vilanova BC, Calux SJ, Carmona Rde C, Timenetsky Mdo C. Gastroenteritis outbreak due to G2P[4] rotavirus and GII norovirus at two correctional facilities in Brazil, 2010. *J Clin Virol*. 2011; 51 (3): 213-214.

Macartney KK, Porwal M, Dalton D, Cripps T, Maldigri T, Isaacs D, Kesson A. Decline in rotavirus hospitalisations following introduction of Australia's national rotavirus immunisation programme. *J Paediatr Child Health*. 2011; 47(5): 266-270.
Mascarenhas JDP, Leite JPG, Lima JC, Heinemann MB, Oliveira DS, Araújo IT, Soares LS, Gusmão RHP, Gabbay YB, Linhares AC. Detection of a neonatal human rotavirus strain with VP4 and NSP4 genes of porcine origin. *Journal of Medical Microbiology*. 2007; 56: 524-532.

Mascarenhas JDP, Lima, CS, De Oliveira DS, Guerra SDF, Maestri RP, Gabbay YB et al. Identification of two sublineages of genotype G2 rotavirus among diarrheic children in Parauapebas, Southern Pará State, Brazil. *J Med Virol*. 2010; 82(4): 712-719.

Mast TC, Khawaja S, Espinoza F, Paniagua M, Del Carmen LP, Cardellino A, Sánchez E. Case-control study of the effectiveness of vaccination with pentavalent rotavirus vaccine in Nicaragua. *Pediatr Infect Dis J*. 2011; 30(11): 209-215.

Matthijnssens J, Ciarlet M, Heiman E, Arijs I, Delbeke T, McDonald SM, Palombo EA, Iturriza-Gómara M, Maes P, Patton JT, Rahman M, Van Ranst M. Full genome-based classification of rotaviruses reveals a common origin between human Wa-like and porcine rotavirus strains and human DS-1-like and bovine rotavirus strains. *J Virol*. 2008; 82: 3204-3219.

Matthijnssens J, Ciarlet M, McDonald SM, Attoui H, Bányai K, Brister JR et al. Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the rotavirus classification

working group (RCWG). *Arch Virol*. 2011; 156(8): 1397-413.

Meng ZD, Birch C, Heath R, Gust I. Physicochemical stability and inactivation of human and simian rotaviruses. *Appl Environ Microbiol*. 1987; 53 (4): 727-730.

Middleton PJ, Szymanski MT, Abbott GD, Bortolussi R, Hamilton JR. Orbivirus acute gastroenteritis of infancy. *The Lancet*. 1974; 1: 1241-1244.

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

Ministério da Saúde (Brasil). Nota técnica 193/2012: Alteração da idade para administração da vacina tríplice viral e da vacina oral de rotavírus humano, a partir de janeiro 2013 Brasília, DF. Programa Nacional de Imunizações, Secretaria de Vigilância Epidemiológica, Ministério da Saúde; 2013.

Molto Y, Cortes JE, De Oliveira LH, Mike A, Solis I, Suman O et al. Reduction of diarrhea-associated hospitalizations among children aged < 5 Years in Panama following the introduction of rotavirus vaccine. *Pediatr Infect Dis J*. 2011; 30 (1 Suppl): S16-20.

Moon S, Wang Y, Dennehy P, Simonsen KA, Zhang J, Jiang B. Antigenemia, RNAemia, and innate immunity in children with acute rotavirus diarrhea. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2012; (3):382-391.

Moon S, Wang Y, Edens C, Gentsch JR, Prausnitz MR, Jiang B. Dose sparing and enhanced immunogenicity of inactivated rotavirus vaccine administered by skin vaccination using a microneedle patch. *Vaccine*. 2013; 31 (34): 3396-3402.

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.

Munford V; Gilio AE; de Souza EC; Cardoso DM; Cardoso DD; Borges AM et al. Rotavirus gastroenteritis in children in 4 regions in Brazil: a hospital-based surveillance study. *J Infect Dis*. 2009; 200 Suppl 1: S106-113.

Munos MK; Walker CL; Black RE. The effect of rotavirus vaccine on diarrhoea mortality. *Int J Epidemiol*. 2010; 39 Suppl 1: i56-62.

Murphy TV, Gargiullo PM, Massoudi MS, Nelson DB, Jumaan AO, Okoro CA et al. Intussusception among infants given an oral rotavirus vaccine. *N. Engl. J. Med*. 2001; 344: 564-572.

Myers PG. Intussusception, rotavirus, and oral vaccines: summary of a workshop. *Pediatrics*. 2002; 110(6): 67.

Nakagomi T, Cuevas LE, Gurgel RG, Elrokhsi SH, Belkhir YA, Abugalia M et al. Apparent extinction of non-G2 rotavirus strains from circulation in Recife, Brazil, after the introduction of rotavirus vaccine. *Arch Virol*. 2008; 153(3): 591-593.

Nguyen TV, Iosef C, Jeong K, Kim Y, Chang K-O, Lovgren-Bengtsson K et al.

Protection and antibody responses to oral priming by attenuated human rotavirus followed by oral boosting with 2/6 rotavirus-like particles with immunostimulating complexes in gonotobiotic pigs. *Vaccine*. 2003; 21: 4059-4070.

Offit PA. Host Factors Associated with Protection against Rotavirus Disease: The Skies Are Clearing. *The Journal of Infectious Diseases*. 1996; 174 (Suppl 1): S59-64.

Olgivie I, Khoury H, Goetghebeuer MM, El Khoury AC, Giaquinto C. Burden of community-acquired and nosocomial rotavirus gastroenteritis in the pediatric population of Western Europe: a scoping review. *BMC Infectious Diseases*. 2012; 12 (62): 1471-2334.

Oliveira A, Mascarenhas JDP, Soares LS, Guerra SFS, Gabbay YB, Sanchez NO, Linhares AC, 2008. Re-emergence of G2 rotavirus serotype in Northern Brazil reflects a natural changing pattern over time. *International Rotavirus Symposium. Proceedings: June 3-4, Istanbul, Turkey*.

Oliveira A, Mascarenhas JDP, Soares LS, Sylvania F.S, Guerra, Gabbay YB, Nervo Sánchez et al. Rotavirus serotype distribution in northern Brazil trends over a 27 year period pre and post national vaccine introduction. *Trials in Vaccinol*. 2012; (1) 1, 4-9.

Omenaca F; Sarlangue J; Szenborn L; Nogueira M; Suryakiran PV; Smolenov IV et al. Safety, reactogenicity and immunogenicity of the human rotavirus vaccine in preterm European Infants: a randomized phase IIIb study. *Pediatr Infect Dis J*. 2012; 31(5): 487-493.

O’Ryan M, Linhares AC. Update on RotarixTM: an oral human rotavirus vaccine. *Expert. Rev. Vaccines*. 2009; 8: 1627-1641.

O’Ryan M. The ever-changing landscape of rotavirus serotypes. *Pediatr Infect Dis J*. 2009;28 (3 Suppl): S60-62.

O’Ryan M, Lucero Y, Linhares AC. Rotarix®: vaccine performance 6 years postlicensure. *Expert Rev Vaccines*. 2011; 10 (12): 1645-1659.

Pai CH, Shahrabadi MS, Ince B. Rapid diagnosis of rotavirus gastroenteritis by a commercial latex agglutination test. *J. Clin. Microbiol*. 1985; 22: 846-850.

Parashar UD, Gibson CJ, Bresee JS, Glass RI. Rotavirus and Severe Childhood Diarrhea. *Emerging Infectious Diseases*. 2006; 12.

Patteau G, Stheneur C, Chevallier B, Perez N. Benign afebrile seizures in rotavirus gastroenteritis. *Arch Paediatr*. 2010; 17 (11): 1527-1530.

Patel M, Pedreira C, de Oliveira LH, Tate J, Orozco M, Mercado J, et al. Association between pentavalent rotavirus vaccine and severe rotavirus diarrhea among children in Nicaragua. *JAMA*. 2009; 301: 2243-2251.

Patel M, Rench MA, Boom JA, Tate JE, Sahni LC, Hull JA et al. Detection of rotavirus antigenemia in routinely obtained serum specimens to augment surveillance and vaccine effectiveness evaluations. *Pediatr Infect Dis J*. 2010; 29 (9): 836-839.

Patel MN, López-Collada VR, Bulhões MM, de Oliveira LH, Bautista MA, Flannery B et al. Intussusception risk and health benefits of rotavirus vaccination in Mexico and

Brazil. *N Engl J Med.* 2011; 364(24): 2283-2292.

PATH [homepage na internet]. Rotavirus Vaccine Introduction Maps. [acesso em 30 ago 2013]. Disponível em: <http://sites.path.org/rotavirusvaccine/rotavirus-advocacy-and-communications-toolkit/country-introduction-maps-and-list/>

Paulke-Korinek M, Rendi-Wagner P, Kundi M, Kronic R, Kollaritsch. Universal mass vaccination against rotavirus gastroenteritis. Impact on hospitalization rates in Austrian children. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2010; 29: 319-323.

Pereira HG, Leite JPG, Azeredo RS, De Farias V, Sutmoller F, 1983. An atypical rotavirus detected in a child with gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz,* 78: 245-250.

Perl S, Goldman M, Berkovitch M, Kozer E. Characteristics of rotavirus gastroenteritis in hospitalized children in Israel. *Isr Med Assoc J.* 2011; 13 (5): 274-277.

Phua KB, Lim FS, Lau YL, Nelson EA, Huang LM, Quak SH et al. Safety and efficacy of human rotavirus vaccine during the first 2 years of life in Asian infants: randomised, double-blind, controlled study. *Vaccine.* 2009; 27,5936-5941.

Quintanar-Solares M, Yen C, Richardson V, Esparza-Aguilar M, Parashar UD, Patel MM. Impact of rotavirus vaccination on diarrhea-related hospitalizations among children < 5 years of age in Mexico. *Pediatr Infect Dis J.* 2011; 30 Suppl 1: S11-15.

Raboni SM, Nogueira MB, Hakim VM, Torrecilha Vt, Lerner H, Tsuchiya LR. Comparison of latex agglutination with enzyme immunoassay for detection of rotavirus in fecal specimens. *Am J Clin Pathol.* 2002; 117(3):392-394.

Ramani S, Paul A, Saravanabavan A, Menon VK, Arumugam R, Sowmyanarayanan TV et al. Rotavirus antigenemia in indian children with rotavirus gastroenteritis and asymptomatic infections. *Clinical Infectious Diseases.* 2010; 51(11): 1284-1289.

Ramig RF. Pathogenesis of intestinal and systemic rotavirus infection. *Journal of Virology.* 2004; 10213-10220.

Ray P, Fenaux M, Sharma S, Malik J, Sudob S, Bhatnagar S, Greenberg H, Glass RI, Gentsch J, Bhan MK. Quantitative evaluation of rotaviral antigenemia in children with acute rotaviral diarrhea. *Journal Infect Dis.* 2006; 194: 588-593.

Richardson V, Hernandez-Pichardo J, Quintanar-Solares M, Esparza-Aguilar M, Johnson B, Gomez-Altamirano CM, Parashar U, Patel M. Effect of rotavirus vaccination on death from childhood diarrhea in Mexico. *N Engl J Med.* 2010; 362 (4): 299-305.

Rissardo LK, Furlan MCR, Marcon SS, Ferrer ALM, Oliveira RG. Hospital morbidity before and after vaccination program against rotavirus in the state of Paraná-Brazil: exploratory-descriptive study. *Online Braz. J. Nursing [Internet]* 9(2), Available from: <http://www.objnursing.uff.br/index.php/nursing/article/view/3053> (2010).

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

Rossignol JF, Abu-Zekry M, Hussein A, Santoro MG. Effect of nitazoxanide for treatment of severe rotavirus diarrhoea: randomised double-blind placebo-controlled trial. *Lancet*. 2006; 368 (9530): 124-129.

Ruiz MC, Cohen J, Michelangeli F. Role of Ca²⁺ in the replication and pathogenesis of rotavirus and other viral infection. *Cell Calcium*. 2000; 28 (3): 137-149.

Ruiz-Palacios G, Pérez-Schael I, Velázquez RF, Pérez-Schael I, Sáez-Llorens X, Abate H et al. Safety and efficacy of an attenuated vaccine against severe rotavirus gastroenteritis. *N. Engl. J. Med*. 2006; 354: 11-22.

Ruzicka T, Rosendahl C, Braun-Falco O. A probable case of rotavirus exanthem. *Arch Dermatol*. 1985; 121(2):253-4.

Ruuska T, Vesikari T. Rotavirus disease in Finnish children: use of numerical scores for clinical diarrhoeal episodes. *Scand J Infect Dis* 1990; 22: 259-267.

Ryan MJ, Ramsay M, Brown D, Gay NJ, Farrington CP, Wall PG. Hospital admissions attributable to rotavirus infection in England and Wales. *J. Infect. Dis*. 1996; 174 (suppl. 1): S12-S18.

Sáfadi MA, Berezin EN, Munford V, Almeida FJ, de Moraes JC, Pinheiro CF, Racz ML. Hospital-based surveillance to evaluate the impact of rotavirus vaccination in São Paulo, Brazil. *Pediatr Infect Dis J*. 2010; 29(11): 1019-1022.

Salvadori M, Saux NL Recommendations for the use of rotavirus vaccines in infants. *Paediatr Child Health*. 2010; 15 (8): 519-528.

Santos N, Hoshino Y. Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *Rev Med Virol*. 2005; 15: 29-26.

Sartori AM, Valentim J, de Soárez PC, Novaes HM. Rotavirus morbidity and mortality in children in Brazil. *Rev Panam Salud Publica*. 2008;23(2):92-100.

Sengupta P. Rotavirus: the challenges ahead. *Indian J Community Med*. 2009; 34 (4): 279-282.

Shim JO, Son DW, Shim SY, Ryoo E, Kim W, Jung YC. Clinical characteristics and genotypes of rotaviruses in a neonatal intensive care unit. *Pediatr Neonatol*. 2012; 53 (1): 18-23.

Shui IM, Baggs J, Patel M, Parashar UD, Rett M, Belongia EA et al. Risk of intussusception following administration of a pentavalent rotavirus vaccine in US infants. *JAMA*. 2012; 8; 307(6): 598-604.

Simonsen L, Morens D, Elixhauser A, Gerber M, Van Raden M, Blackwelder W. Effect of rotavirus vaccination programme on trends in admission of infants to hospital for intussusception. *The Lancet*. 2001; 358: 1224-1229.

Siqueira AA, Santelli AC, Alencar LR Jr, Dantas MP, Dimech CP, Carmo GM et al. Outbreak of acute gastroenteritis in young children with death due to rotavirus genotype G9 in Rio Branco, Brazilian Amazon region, 2005. *Int J Infect Dis*. 2010; 14 (10): e898-

903.

Snelling TL, Schultz R, Graham J, Roseby R, Barnes GL, Andrews RM, Carapetis JR. Rotavirus and the indigenous children of the Australian outback: monovalent vaccine effective in high-burden setting. *Clin Infect Dis*. 2009; 49: 428-431.

Soares-Weiser K, Maclehorse H, Bergman H, Ben-aharon I, Nagpal S, Goldberg E et al. Vaccines for preventing rotavirus diarrhea: vaccines in use. *Cochrane Database Systemic Review*. 2012; 11: CD008521.

Sood M, Booth I. Is prolonged rotavirus infection a common cause of protracted diarrhea? *Arch Dis Child*. 1999; 80 (4): 309-310.

Steele AD, Madhi SA, Louw CE, Bos P, Tumbo JM, Werner CM et al. Safety, Reactogenicity, and Immunogenicity of Human Rotavirus Vaccine RIX4414 in Human Immunodeficiency Virus-positive Infants in South Africa. *Pediatr Infect Dis J*. 2011; 30(2): 125-130.

Sugata K, Taniguchi K, Yui A, Miyake F, Suga S, Asano W et al. Analysis of rotavirus antigenemia and extraintestinal manifestations in children with rotavirus gastroenteritis. *Pediatrics*. 2007; 122(2): 392-397.

Sugata K, Taniguchi K, Yui A, Nakai H, Asano Y, Hashimoto S et al. Analysis of rotavirus antigenemia in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Transpl Infect Dis*. 2012; 14 (1): 49-56.

Tafazoli F, Zeng CQ, Estes MK, Magnusson KE, Svensson L. NSP4 enterotoxin of rotavirus induces paracellular leakage in polarized epithelial cells. *Virol*. 2001; 75 (3):1540-1546.

Tai IC, Huang YC, Lien RI, Huang CG, Tsao KC, Lin TY. Clinical manifestations of a cluster of rotavirus infection in young infants hospitalized in neonatal care units. *J Microbiol Immunol Infect*. 2012; 45 (1): 15-21.

Taneja DK, Malik A. Burden of rotavirus in India--is rotavirus vaccine an answer to it? *Indian J Public Health*. 2012; 56 (1): 17-21.

Tate JE, Burton AH, Boschi-Pinto C, Steele AD, Duque J, Parashar UD; WHO-coordinated Global Rotavirus Surveillance Network. 2008 estimate of worldwide rotavirus-associated mortality in children younger than 5 years before the introduction of universal rotavirus vaccination programmes: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2012; 12(2): 136-141.

Tate JE, Parashar UD. Monitoring impact and effectiveness of rotavirus vaccination. *Expert Rev Vaccines*. 2011; 10(8):1123-1125.

Tate JE, Patel MM, Steele AD, Gentsch JR, Payne JC, Cortese MM, Nakagomi O et al. Global impact of rotavirus vaccines. *Expert Rev Vaccines*. 2011; 9: 395-407.

Teran CG, Teran-Escalera CN, Villarroel P. Nitazoxanide vs. probiotics for the treatment of acute rotavirus diarrhea in children: a randomized, single-blind, controlled trial in Bolivian children. *Int J Infect Dis*. 2009; 13(4): 518-523.

Tian P, Estes MK, Hu Y, Ball JM, Zeng CQ, Schilling WP. The rotavirus nonstructural

glycoprotein NSP4 mobilizes Ca^{2+} from the endoplasmic reticulum. *Journal of Virology*. 1995; 5673-5772.

Thouless ME, Bryden AS, Flewett TH. Rotavirus neutralization by human milk. *Br. Med. J.* 1977; 2: 1390.

Velázquez FR, Matson DO, Calva JJ, Guerrero L, Morrow AL, Cartel-Campbell S et al. Rotavirus infection in infants as protection against subsequent infections. *N. Engl. J. Med.* 1996; 335: 1022-1028.

Vesikari T, Karvonen A, Ferrante SA, Ciarlet M. Efficacy of the pentavalent rotavirus vaccine, RotaTeq(TM), in Finnish infants up to 3 years of age: the Finnish Extension Study. *Eur. J. Pediatr.* , 2010; 169(11): 1379-1386.

Vesikari T, Matson DO, Dennehy P, Van Damme P, Santosham M, Rodriguez Z et al. Rotavirus Efficacy and Safety Trial (REST) Study Team. Safety and efficacy of a pentavalent human-bovine (WC3) reassortant rotavirus vaccine. *N Engl J Med.* 2006; 354: 23-33.

Wang Y, Azevedo M, Saif LJ, Gentsch JR, Glass RI, Jiang B. Inactivated rotavirus vaccine induces protective immunity in gnotobiotic piglets. *Vaccine.* 2010; 28 (33):5432-6.

Ward RL, Bernstein DI, Young EC, Sherwood JR, Knowlton DR, Schiff GM. Human rotavirus studies in volunteers: determination of infectious dose and serological response to infection. *J Infect Dis.* 1986; 154(5): 871-880.

Ward RL, Mcneal MM, Steele AD. Why does the world need another rotavirus vaccine? *Therapeutics and Clinical Risks Management.* 2008; (4): 49-63.

Ward R. Mechanisms of protection against rotavirus infection and disease. *Pediatr Infect Dis J.* 2009; 28 (3): S57-59.

Widdowson MA, Van Doornum GJ, Van der Poel WH, De Boer AS, Mahdi U, Koopmans M. Emerging group-A rotavirus and a nosocomial outbreak of diarrhoea. *Lancet.* 2000; 356 (9236): 1161-1162.

Widdowson M, Bresee JS, Gentsch JR, Glass R.. Rotavirus disease and its prevention. *Current Opinion in Gastroenterology.* 2005; 21:26-31.

Widdowson M, Steele D, Vojdani J, Wecker J, Parashar U. Global rotavirus surveillance: determining the need and measuring the impact of rotavirus vaccines. *JID.* 2009; 200 (Suppl 1): S1-S8.

Wildi-Runge S, Allemann S, Schaad UB, Heininger U. A 4-year study on clinical characteristics of children hospitalized with rotavirus gastroenteritis. *Eur J Pediatr.* 2009; 168(11):1343-1348.

WHO (World Health Organization), GAVI (Global Alliance of Vaccines and Immunization). GAVI task force for R & D rotavirus vaccine agenda meeting fast-tracking rotavirus vaccine development and introduction in developing countries: preparing a global agenda, Geneva, 14-15 May, 2001.

WHO (World Health Organization). Implementing the new recommendations on the

clinical management of diarrhoea: guidelines for policy makers and programme managers. © World Health Organization; 2006.

WHO (World Health Organization). Rotavirus vaccines. *Wkly Epidemiol Rec.* 2007; 82 (32): 285-296.

WHO (World Health Organization). Levels & Trends in Child Mortality Report 2012. Estimates Developed by the UN Inter-agency Group for Child Mortality Estimation, 2012.

WHO (World Health Organization). Rotavirus vaccines, 2009. *Wkly. Epidemiol. Rec.* 84: 533-240.

WHO (World Health Organization). Rotavirus vaccines, 2013. *Wkly. Epidemiol. Rec.* 88: 49-64.

Yang K, Wang S, Chang KO, Lu S, Saif LJ, Greenberg HB et al. Immune responses and protection obtained with rotavirus VP6 DNA vaccines given by intramuscular injection. *Vaccine.* 2001; 19 (23-24): 3285-3291.

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

Yoder, JD; Dormitzer, PR. Alternative Intermolecular Contacts underlie the rotavirus VP5* two-to three-fold rearrangement. *The EMBO Journal.* 2006; 25: 1559-1568.

Yolken RH, Peterson JA, Vonderfecht SL, Fouts ET, Midthun K, Newburg DS, 1992. Human milk mucin inhibits rotavirus replication and prevents experimental gastroenteritis. *J. Clin. Invest.*, 5: 1984-1991.

Youssef WF, Ramirez RP, Plana JC, Marfa MP. Benign afebrile convulsions in the course of mild acute gastroenteritis: a study of 28 patients and a literature review. *Pediatr Emerg Care.* 2011; 27 (11): 1062-1064.

Zambrano JL, Sorondo O, Alcala A, Vizzi E, Diaz Y, Ruiz MC, Michelangeli F, Liprandi F, Ludert JE. Rotavirus infections of cells in cultures induces activation of RHoA and changes in the actin and tubulin cytoskeleton. *Plos One.* 2012; 7(10): e47612.

Zeller M, Rahman M, Heylen E, De Coster S, De Vos S, Arijs I et al. Rotavirus incidence and genotype distribution before and after national rotavirus vaccine introduction in Belgium. *Vaccine.* 2010; 28(47):7507-7513.

ANEXOS

ANEXO A - Aprovação ética



Carta de nº 002/2008
 Protocolo CEP/IEC - Nº 0003/08
 CAAE: 0003.0.072.000-08

Ananindeua/PA, 26 de fevereiro de 2008.

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA'

Projeto: “Estudo caso-controle para avaliar a efetividade da vacina Rotarix ® na prevenção de gastroenterite grave por rotavírus (SGE por RV) entre crianças hospitalizadas nascidas após 6 de março de 2006 e com pelo menos 12 semanas de idade, em Belém, no Brasil”.

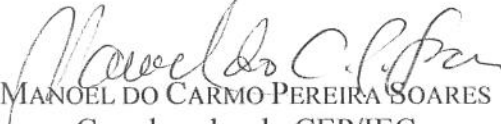
Pesquisador Responsável: ALEXANDRE DA COSTA LINHARES

Conforme reunião do CEP/IEC realizada no dia 25 de fevereiro de 2008, o projeto em questão foi considerado **aprovado**.

Recomenda-se ao coordenador que mantenha atualizados todos os documentos pertinentes ao projeto, inclusive, as fichas preenchidas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Este CEP se incumbirá dos procedimentos de acompanhamento preconizados pela Resolução 196/96 e suas complementares, do Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde.

Relatório Final - deverá ser elaborado um consolidado, incluindo os resultados finais da pesquisa, em um prazo máximo de 60 (sessenta) dias, após a finalização da mesma.


 MANOEL DO CARMO PEREIRA SOARES
 Coordenador do CEP/IEC

ANEXO B – Escore de Ruuska e Vesikari (1990)

Experiência Adversa	Pontos
Duração das evacuações com fezes mais amolecidas que o normal (dias) 1-4 5 ≥ 6	1 2 3
Nº máximo de evacuações com fezes mais amolecidas que o normal /24 horas 1-3 4-5 ≥ 6	1 2 3
Duração dos vômitos (dias) 1 2 ≥ 3	1 2 3
Nº máximo de episódios de vômitos/24 horas 1 2-4 ≥ 5	1 2 3
Febre* Temperatura Axilar 36,6-37,9°C 38,0-38,4°C ≥ 38,5°C	1 2 3
Desidratação 1-5% ≥ 6%	2 3
Tratamento Reidratação Hospitalização	1 2

Escore de gravidade: Leve < 7; Moderado: 7-10; Grave: ≥ 11

Um participante com episódio de gastroenterite é considerado desidratado entre 1 e 5% se recebeu reidratação oral e considerado desidratação ≥6% se recebeu reidratação EV e/ou foi hospitalizado.