

Caracterización molecular de rotavirus humano tipo G1 detectado en niños de Belém, Estado de Pará, Brasil

Caracterização molecular de rotavírus humanos do tipo G1 detectados em crianças de Belém, Pará, Brasil
Molecular characterization of G1 human rotaviruses detected in children from Belém, Pará, Brazil

Luana da Silva Soares
Seção de Virologia, Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua,
Pará, Brazil

Rosa Helena Porto Gusmão
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade do Estado do
Pará, Belém, Pará, Brazil

Joana D'Arc Pereira Mascarenhas
Seção de Virologia, Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua,
Pará, Brazil

Alexandre da Costa Linhares
Seção de Virologia, Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua,
Pará, Brazil

Yvone Benchimol Gabbay
Seção de Virologia, Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua,
Pará, Brazil

RESUMEN

Los rotavirus son responsables por 40% de los casos de gastroenteritis infantil en el mundo, con más de 611 mil muertes al año, y el rotavirus tipo G1 representa su genotipo más común en circulación. El objetivo de este trabajo fue realizar la caracterización molecular de las muestras de rotavirus de tipo G1 obtenido en niños que participaron en estudios realizados anteriormente en Belém, ciudad situada en el norte de Brasil, durante un período de 21 años (1982 a 2003). El rotavirus de tipo G1 fue detectado por electroforesis en gel de poliacrilamida, e inmunoensayo enzimático (IEE), y por la reacción en cadena de la polimerasa precedida por transcriptasa inversa para los genes VP7 y VP4. De las 798 especies positivas para rotavirus, 330 (41%) presentaron especificidad G1 por IEE, usando anticuerpos monoclonales. Se analizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa precedida de transcripción inversa un total de 148 cepas de tipo G1. La caracterización de genotipos P y electroferotipos de rotavirus de tipo G1 se produjo en las frecuencias de 78% y 88%, respectivamente. Se identificaron tres variedades de electroferotipos largos, siendo el L1 predominante (79%). La combinación G1P [8] fue el más frecuente, representando el 64% de los casos. Las infecciones mixtas G1P[6]+P[8], G1P[4]+P[8], G1P[4]+P[6] y G1P[4]+P[6]+P[8] fueron encontradas en 11 (7%), 11 (7%), 3 (2%) y 1 (0,6%) de las muestras, respectivamente. Se identificó una muestra que presentaba una infección mixta G1+G4. Cabe señalar que este es el primer estudio que analiza la caracterización molecular del rotavirus tipo G1 en Brasil. Nuestros hallazgos harán posible una mejor comprensión de la diversidad molecular asociada a la infección por rotavirus de tipo G1 en nuestra región.

Palabras clave: Gastroenteritis; Infecciones por Rotavirus; Variación Genética.

INTRODUCCIÓN

El rotavirus del grupo A (RV-A) es el agente etiológico más común de la diarrea severa en el mundo, siendo responsable por 40% de las infecciones por gastroenteritis y resultando en 611 mil muertes de recién nacidos y niños, anualmente, particularmente en los países más pobres. El alcance global de esta enfermedad es bien reconocido – en verdad, todas los niños presentan un caso de gastroenteritis causada por rotavirus antes de los 5 años de edad^{7,24,25}.

Este virus pertenece a la familia *Reoviridae* Reoviridae y se clasifica en siete grupos (A-G) y cuatro subgrupos (I, II, I + II, y no-I/II) de acuerdo a las especificidades de los epítomos de la proteína VP6 localizados en la cápside interna. El genoma del rotavirus contiene 11 segmentos de RNA de cadena doble (dsRNA) localizados en el core de la cápside de triple camada. La cápside externa está compuesta de dos proteínas estructurales, VP4 e VP7, que definen los genotipos P (proteína clivada por proteasas) y G (glicoproteína), respectivamente. Con base en la movilidad de los 11 segmentos en geles de poliacrilamida, los rotavirus pueden ser identificados como electroferotipos largos, cortos o súper cortos¹¹.

Hasta hoy, al menos 23 rotavirus del tipo G y 30 del tipo P fueron identificados tomándose por base el análisis de la secuencia nucleotídica de los genes VP7 y VP4, respectivamente. Sin embargo, se sabe que pocos genotipos causan infección en humanos^{5,6,11,31,32}. A pesar de un gran número de combinaciones G/P ser teóricamente posible, estudios epidemiológicos en todo el mundo han registrado la circulación de cinco tipos más comunes: G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8] y G9P[8]^{6,7,11,19,29}.

Correspondencia / Correspondência / Correspondence:

Luana da Silva Soares
Instituto Evandro Chagas
Rodovia BR316, km 7, s/nº, Levilândia
CEP: 67030-000 Ananindeua-Pará-Brasil
Fax + 00 55 91 32142006
E-mail: luanasoares@iec.pa.gov.br

Traducido por / Traduzido por / Translated by:

Rocio Tamara (resumen) y Lota Moncada (artículo)

El genotipo G1 es el más prevalente y ha sido detectado en frecuencias que varían entre 36% y 74% en diferentes regiones del mundo, siendo que las muestras G1P[8] representan aproximadamente 65% de todos los rotavirus identificados²⁹. Castello et al⁶ identificaron especímenes G1P[8] en 40% de las infecciones por rotavirus en América Latina. Recientemente, Leite et al¹⁹ detectaron el tipo G1 en 43% de los casos durante el período pre-vacunación en Brasil; en contraste, luego de la introducción de la vacunación, la ocurrencia de este genotipo se redujo a 3% de las infecciones por rotavirus, debido a la gran predominancia de muestras G2P[4].

El análisis de la secuencia del gen VP7 de rotavirus G1 en Italia reveló la existencia de al menos, tres linajes genéticos. Estas variantes antigénicas pueden ser responsables por la circulación continua de rotavirus del tipo G1². Phan et al²⁸ analizaron el gen VP7 de rotavirus del tipo G1 colectados en varias partes del mundo y sugirieron una nueva taxonomía, que incluye 11 linajes y 17 sublinajes.

El objetivo del presente estudio fue de realizar la caracterización molecular de las muestras de rotavirus del tipo G1 obtenidas de niños que participaron en varios estudios anteriormente llevados a cabo en Belém, norte de Brasil, por un período de 21 años (de 1982 a 2003).

MATERIALES Y MÉTODOS

PACIENTES Y ESPECÍMENES CLÍNICOS

Los especímenes obtenidos en cinco estudios sobre gastroenteritis viral realizados en Belém, Brasil, entre diciembre de 1982 y octubre de 2003, se analizaron con vistas a la detección de rotavirus^{1,15,20,21}. De los 798 especímenes positivos para rotavirus por ensayo inmunoenzimático (EIA), 330 (41%) presentaban especificidad G1 cuando se utilizaron anticuerpos monoclonales. Para confirmar ese resultado, fueron analizadas 148 muestras de rotavirus del tipo G1 por medio de la reacción en cadena mediada por la polimerasa precedida de transcripción reversa (RT-PCR). Este análisis involucró todas las muestras de rotavirus G1 detectadas en los Estudios A, B, C y D, y 20% de los casos de Estudio E. Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Instituto Evandro Chagas, Secretaría Nacional de Vigilancia en

Salud.

EXTRACCIÓN DEL RNA

Rotavirus dsRNA was extracted from 10% fecal suspension by using guanidinium isothiocyanate-silica nucleic acid extraction as described previously by Boom et al³.

ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA (PAGE)

El perfil del RNA fue analizado por PAGE con tinción con nitrato de plata, conforme descrito anteriormente^{16,27}.

CARACTERIZACIÓN DE LOS GENOTIPOS G Y P DE ROTAVIRUS POR MEDIO DE REACCIÓN EN CADENA MEDIADA POR LA POLIMERASA PRECEDIDA POR TRANSCRIPCIÓN REVERSA (RT-PCR)

El genotipo G (VP7) fue determinado por transcripción reversa seguida por PCR-multiplex, como ya descrito en la literatura^{9,14,18}. Dos diferentes grupos de iniciadores específicos se utilizaron para el genotipado: mezcla A, conteniendo los iniciadores específicos para G1 (9T1-1), G2 (9T1-2), G3 (9T-3P), G4 (9T-4) y G9 (9T-B); y mezcla B, conteniendo iniciadores específicos para los genotipos G5 (FT5), G6 (DT6), G8 (HT8) y G10 (ET10).

La determinación del genotipo P (VP4) fue realizada por medio de RT-PCR seguida de nested-PCR, conforme descrito por Gentsch et al¹². En resumen, el gen completo de la proteína VP4 fue sometido a transcripción reversa, y un fragmento de 876 pares de base fue amplificado. Se utilizaron iniciadores específicos para los genotipos P[8] (1T-1), P[4] (2T-1), P[6] (3T-1) y P[9] (4T-1)

RESULTADOS

EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE LA INFECCIÓN POR ROTAVIRUS DEL TIPO G1

La mayor frecuencia de rotavirus del tipo G1 (68%, 232 de 343) se encontró durante una vigilancia realizada en 2003, en hospitales pediátricos, mientras que la menor (11%, 31 de 281) se verificó durante otra investigación involucrando niños hospitalizados, realizada entre 1998 y 2000 (Tabla 1). La edad promedio de los 148 niños infectados por G1 fue de 13 meses de edad (variando entre 2 meses y 3 años), de las los 70 (47%) tenían <1 año,

Table 1 – Características de los estudios por rotavirus en Belém, Pará, Brasil, de 1982-2003

Estudio, Título Abreviado	Características	Período	Franja Etaria	Nº muestras Positivas para RV	Frecuencia de RV G1	Referencia
A, Estudio longitudinal	Ambulatorio	Diciembre de 1982 a marzo de 1986	0 – 3 años	36/441 (8%)	25% (9/36)	Linhares ²⁰ (1989)
B, Test con la vacuna RRV-TV	Test doble-ciego controlado con placebo	Junio de 1990 a junio de 1992	1 mes - 2 años	90/1990 (4%)	49% (44/90)	Linhares ²¹ (1996)
C, Nosocomial/ infección en comunidad	Hospitalario	Noviembre de 1992 a mayo de 1994	0 - 5 años	48/290 (16%)	29% (14/48)	Gusmão ¹⁵ (1999)
D, Estudio Hospital-Centinel	Hospitalario	Mayo de 1998 a mayo de 2000	0 - 3 años	281/834 (34%)	11% (31/281)	Gabbay (comunicación)
E, Vigilancia pre-vacunación	Hospitalario	Marzo a octubre de 2003	0 - 5 años	343/762 (45%)	68%* (232/343)	Abate ¹ (2004)

* 50 Las muestras se seleccionaron para la revisión.

PAGE DE LAS MUESTRAS G1

Los perfiles de RNA fueron visualizados en 116 (78%) de las 148 muestras testeadas. Tres variedades de electroferotipos largos (L1, L2 y L3) fueron identificadas con base en las diferencias de migración de los segmentos genómicos 2, 5 y 10. Cuando se realiza la comparación del electroferotipo L1 con el L2, el segmento 2 de la variedad L2 migró más lentamente que su correlato L1. En relación a L3, se observaron diferencias de migración entre los segmentos 5 y 10, en comparación a L1. Un segmento extra fue encontrado en una muestra presentando el perfil L1 (Figura 1). El electroferotipo más frecuente fue L1 (79%, 92 de 116). El Estudio E presentó el mayor número de muestras caracterizadas por PAGE (96%, 48 de 50).

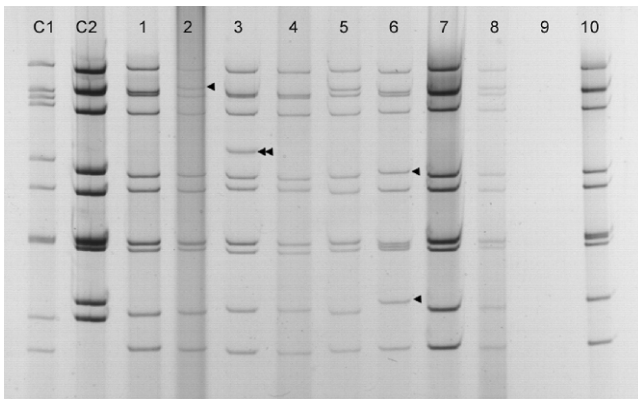


Figura 1 – Electroforesis en gel de poliacrilamida de muestras de rotavirus del tipo G1 identificadas en Belém, Pará, Brasil. C1: Control, electroferotipo corto; C2: Control, electroferotipo largo; Muestras 1, 3, 4, 7 y 10 – perfil L1 de RNA; Muestras 2, 5 y 8 – perfil L2 de RNA; Muestra 6 – perfil L3 de RNA; Muestra 9 – no caracterizada (▲ grandes diferencias en la migración de segmentos de los genes; ◀ segmento extra)

Table 2 – Electroferotipos y genotipos P de 148 muestras de rotavirus del tipo G1 colectadas entre 1982 y 2003 en Belém, Pará, Brasil.

Muestras	Electroferotipos				Total
	L1	L2	L3	NC*	
G1P[8]	66	13	2	13	94
G1P[4]	2	1	–	1	4
G1P[6]	1	1	–	4	6
G1P[4]+[6]	1	–	1	1	3
G1P[4]+[8]	6	1	–	4	11
G1P[6]+[8]	7	1	1	1	10
G1P[4]+[6]+[8]	1	–	–	–	1
G1+G4P[6]+P[8]	–	–	–	1	1
G1P[NT]†	8	3	–	7	18
Total	92	20	4	32	148

Observación: Señales convencionales utilizadas:

– Datos numéricos iguales a cero;

* NC: no caracterizados por PAGE;

† NT: no tipados para P.

GENOTIPADO DE LOS TIPOS G Y P DE ROTAVIRUS

Fueron detectadas 147 muestras conteniendo especificidad para el tipo G1 y una muestra presentando una infección mixta G1+G4. El genotipo P puede ser determinado en 130 (88%) muestras. El tipo P[8] fue lo más frecuente (64% de los casos). Además de eso, las infecciones mixtas P[6] + P[8], P[4] + P[8], P[4] + P[6] e P[4] + P[6] + P[8] fueron encontradas en 11 (7%), 11 (7%), 3 (2%) e 1 (0.6%) muestras, respectivamente. La Tabla 2 presenta la caracterización de 148 muestras por PAGE y RT-PCR (genes VP4 y VP7). La combinación G1P[8], que presenta el estándar L1, fue responsable por 45% de las infecciones.

DISCUSIÓN

El rotavirus del tipo G1 todavía aparenta ser el genotipo más prevalente, representando cerca de mitad de las muestras circulantes en todo el mundo²⁹. En países desarrollados, el genotipo G1 presenta las frecuencias más altas (70%-73%), mientras que en países en desarrollo, esas tasas parecen ser menores (36%-57%). Esa diferencia puede ser atribuida a la circulación más frecuente de muestras incommunes, así como a la emergencia de nuevos genotipos en los países más pobres^{13,29}. En este estudio, el tipo G1 fue detectado en 41% de los casos de rotavirus durante los 21 años de investigación usando diferentes abordajes en las poblaciones estudiadas. Los resultados aquí presentados son semejantes a los de estudios realizados en Rio de Janeiro, en donde 50% de las muestras obtenidas de niños con diarrea aguda eran del tipo G1³³. Parra et al²⁶ identificaron el tipo G1 en 17% de los casos en una investigación realizada en el Paraguay, entre 1998 y 2000. Esta diferencia puede estar relacionada a la alta prevalencia del G4 y a la detección del G9 en aquel estudio.

Las tasas de rotavirus G1 variaron entre 11% y 68% en las investigaciones analizadas. Las menores tasas se observaron en el período entre 1998 y 2000. Estos resultados se relacionan, probablemente, a la alta frecuencia de especímenes no tipados, bien como a la emergencia del G9 durante este período. Santos et al³⁰ registraron que 79% de todas las muestras analizadas en la ciudad de Salvador eran del tipo G9. Resultados semejantes también fueron observados en Goiás, en donde Costa et al⁸, detectaron 34% de infecciones por rotavirus del tipo G9. Estos descubrimientos sugieren que la emergencia del tipo G9 en Brasil fue seguida por una amplia circulación de muestras presentando este genotipo.

Se destaca que, en este estudio, todas las muestras G1 presentaron electroferotipos largos. Estos perfiles de RNA presentaron tres diferentes estándares, lo que demuestra la existencia de una gran diversidad de electroferotipos en la región. Todas las variedades fueron detectadas en los especímenes de los Estudios B y D, que, por su vez, presentaron una alta frecuencia de muestras incommunes y no tipadas (datos no presentados). Luz et al²² detectaron dos variedades de electroferotipos largos, y 19% de los especímenes del tipo G1 presentaron perfil corto, con tres variedades circulando entre niños con diarrea en el Estado de Maranhão.

El G1P[8] ya fue considerado en diversos países como el genotipo circulante predominante²⁹. En el presente estudio, este genotipo fue detectado en 64% de las

muestras. Datos semejantes fueron obtenidos por Gentsch et al¹³ y Castello et al⁶ en investigaciones realizadas en América Latina. Esos estudios registraron la ocurrencia de esta combinación en 52% y 40% de las infecciones por rotavirus, respectivamente. En Brasil, Carmona et al⁴ detectaron el G1P[8] en 67% de los especímenes colectados en un período de ocho años en São Paulo.

En nuestro análisis encontramos una infección mixta involucrando a los genotipos G1+G4. Mascarenhas et al²³ analizaron muestras fecales de un niño recién nacido hospitalizado con diarrea leve/moderada adquirida en comunidad y observaron la ocurrencia de mezcla G1+G4. Kebaabetswe et al¹⁷, en una investigación realizada en Botsuana abarcando niños con gastroenteritis, detectaron las infecciones mixtas G1+G2, G1+G8 y G1+G3+G9 en 6%, 22% y 6% de los casos, respectivamente.

Es importante resaltar la frecuencia de infecciones mixtas

involucrando a los rotavirus del tipo G1 (17% de los casos). Das et al¹⁰ documentaron 30% de los casos con infecciones mixtas en una investigación con niños hospitalizados en India, a pesar de otros tipos G haber sido descritos. Las mayores tasas de infecciones mixtas fueron detectadas principalmente en países en desarrollo, probablemente por la ocurrencia de rearreglos genéticos de rotavirus, lo que puede llevar a la emergencia de nuevos tipos G y P de rotavirus circulantes, bien como al escape de especímenes mutantes.

Por lo que sabemos, este es el primer estudio a abordar la caracterización molecular de rotavirus del tipo G1 en Brasil. Nuestros hallazgos suministran datos que permitirán una mejor comprensión a respecto de la diversidad molecular asociada a las infecciones por este tipo de rotavirus antes del advenimiento de la vacuna. Abordajes más específicos abarcando la secuenciación de nucleótidos pueden ser aplicados para evaluar la



Caracterização molecular de rotavírus humanos do tipo G1 detectados em crianças de Belém, Pará, Brasil

RESUMO

Os rotavírus são responsáveis por 40% das ocorrências de gastroenterites infantil no mundo, resultando em 611 mil mortes anualmente, e o rotavírus do tipo G1 representa o seu genótipo circulante mais comum. O objetivo do presente artigo foi realizar a caracterização molecular das amostras de rotavírus do tipo G1 obtidas de crianças que participaram de estudos anteriormente conduzidos na Cidade de Belém, norte do Brasil, por um período de 21 anos (1982 a 2003). O rotavírus do tipo G1 foi detectado por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida, ensaio imunoenzimático (EIA) e reação em cadeia da polimerase precedida da transcrição reversa para os genes VP7 e VP4. Dos 798 espécimes positivos para rotavírus, 330 (41%) apresentavam especificidade G1 por EIA, usando anticorpos monoclonais. Um total de 148 amostras do tipo G1 foram analisadas por meio da reação em cadeia da polimerase precedida da transcrição reversa. A caracterização dos eletroferotipos e genótipos P dos rotavírus do tipo G1 ocorreu em frequências de 78% e 88%, respectivamente. Três variedades de eletroferotipos longos foram identificados, sendo L1 a predominante (79%). A combinação G1P[8] foi a mais frequente, responsável por 64% dos casos. As infecções mistas G1P[6]+P[8], G1P[4]+P[8], G1P[4]+P[6] e G1P[4]+P[6]+P[8] foram encontradas em 11 (7%), 11 (7%), 3 (2%) e 1 (0,6%) amostras, respectivamente. Uma amostra apresentando infecção mista G1+G4 foi identificada. Ressalte-se que este é o primeiro estudo a abordar a caracterização molecular de rotavírus do tipo G1 no Brasil. Nossos achados permitirão melhor compreensão a respeito da diversidade molecular associada às infecções por rotavírus do tipo G1 em nossa região.

Palavras-chave: Gastroenterites; Infecções por Rotavírus; Variação Genética.

Molecular characterization of G1 human rotaviruses detected in children from Belém, Pará, Brazil

ABSTRACT

Rotavirus is responsible for 40% of gastroenteritis infections worldwide, resulting in 611 thousand deaths annually among infants and young children. The aim of the present study was to perform molecular characterization of strains of the most common circulating rotavirus genotype (G1), which was obtained from children participating in studies previously conducted in Belém, northern Brazil over a 21-year period (1982 to 2003). G1 type rotavirus was detected by polyacrylamide gel electrophoresis, enzyme immunoassay and by reverse transcription polymerase chain reaction for the VP7 and VP4 genes. Of 798 specimens that were found to be positive for rotavirus, 330 (41%) had G1-specificity by EIA using monoclonal antibodies. A total of 148 G1 strains were analyzed by reverse transcription polymerase chain reaction. Electropherotypes and P genotypes characterization of G1 rotavirus occurred at frequencies of 78% and 88%, respectively. Three long electropherotype varieties were identified, with the L1 variety the most frequently found (79%). The G1P[8] combination was the most frequent, responsible for 64% of cases. Mixed infections of G1P[6]+P[8], G1P[4]+P[8], G1P[4]+P[6] and G1P[4]+P[6]+P[8] were found in 11 (7%), 11 (7%), 3 (2%) and 1 (0.6%) samples, respectively. One sample displaying a mixed G1+G4 infection was found. To our knowledge, this is the first study to focus on G1 rotavirus molecular characterization in Brazil. Our findings provide information that will allow a better understanding of the molecular diversity of G1 rotavirus infections in our region.

Keywords: Gastroenteritis; Rotavirus Infections; Genetic Variation.



REFERENCES

- 1 Abate H, Linhares AC, Venegas G, Vergara R, Lopez P, Jimenez E, et al. Results of a hospital-based study on rotavirus gastroenteritis in Latin American children [abstract]. In: 24th International Congress of Pediatrics (ICP); 2004 Aug 15-20; Cancun, Mexico; 2004. p. 656.
- 2 Arista S, Giammanco GM, De Grazia S, Ramirez S, Lo Biundo C, Colomba C, et al. Heterogeneity and temporal dynamics of evolution of G1 human rotaviruses in a settled population. *J Virol*. 2006 Nov;80(21):10724-33.
- 3 Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol*. 1990 Mar;28(3):495-503.
- 4 Carmona RC, Timenetsky MC, Morillo SG, Richtzenhain LJ. Human rotavirus serotype G9, São Paulo, Brazil, 1996-2003. *Emerg Infect Dis*. 2006 Jun;12(6):963-8.
- 5 Castello AA, Argüelles MH, Rota RP, Olthoff A, Jiang B, Glass RI, et al. Molecular epidemiology of group A rotavirus diarrhea among children in Buenos Aires, Argentina, from 1999 to 2003 and emergence of the infrequent genotype G12. *J Clin Microbiol*. 2006 Jun;44(6):2046-50.
- 6 Castello AA, Arvay ML, Glass RI, Gentsch J. Rotavirus strain surveillance in Latin America: a review of the last nine years. *Pediatr Infect Dis J*. 2004 Oct;23(10 Suppl):S168-72.
- 7 Centers for Disease Control and Prevention. Rotavirus surveillance—worldwide, 2001-2008. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2008 Nov;57(46):1255-7.
- 8 Costa PS, Cardoso DD, Grisi SJ, Silva PA, Fiaccadori F, Souza MB, et al. Rotavirus A infections and reinfections: genotyping and vaccine implications. *J Pediatr (Rio J)*. 2004 Mar-Apr;80(2):119-22.
- 9 Das BK, 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 Jul;32(7):1820-2.
- 10 Das S, Varghese V, Chaudhuri S, Barman P, Kojima K, Dutta P, et al. Genetic variability of human rotavirus strains isolated from Eastern and Northern India. *J Med Virol*. 2004 Jan;72(1):156-61.
- 11 Estes MK, Kapikian AZ. Rotaviruses. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields virology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2007. p. 1917-74.
- 12 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 Jun;30(6):1365-73.
- 13 Gentsch JR, Laird AR, Bielfelt B, Griffin DD, Banyai K, Ramachandran M, et al. Serotype diversity and reassortment between human and animal rotavirus strains: implications for rotavirus vaccine programs. *J Infect Dis*. 2005 Sep;192 Suppl 1:S146-59.
- 14 Gouvea V, Santos N, Timenetsky MC. Identification of bovine and porcine rotavirus G types by PCR. *J Clin Microbiol*. 1994 May;32(5):1338-40.
- 15 Gusmão RH, Mascarenhas JD, Gabbay YB, Lins-Lainson Z, Ramos FL, Monteiro TA, et al. Rotavirus subgroups, G serotypes, and electrophoretotypes in cases of nosocomial infantile diarrhoea in Belém, Brazil. *J Trop Pediatr*. 1999 Apr;45(2):81-6.
- 16 Herring AJ, Inglis NF, Ojeh CK, Snodgrass DR, Menzies JD. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. *J Clin Microbiol*. 1982 Sep;16(3):473-7.
- 17 Kebaabetswe LP, Sebunya TK, Matsheka MI, Ndung'u T. Detection and molecular characterisation of group A rotavirus from children in northern Botswana. *East Afr Med J*. 2005 Apr;82(4):203-8.
- 18 Leite JP, Alfieri AA, Woods PA, Glass RI, Gentsch JR. Rotavirus G and P types circulating in Brazil: characterization by RT-PCR, probe hybridization, and sequence analysis. *Arch Virol*. 1996;141(12): 2365-74.
- 19 Leite JP, Carvalho-Costa FA, Linhares AC. Group A rotavirus genotypes and the ongoing Brazilian experience: A review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2008 Dec;103(8):745-53.
- 20 Linhares AC, Gabbay YB, Freitas RB, Travassos da Rosa ES, Mascarenhas JD, Loureiro ECB. Longitudinal study of rotavirus infections among children from Belém, Brazil. *Epidemiol Infect*. 1989 Feb;102(1):129-45.
- 21 Linhares AC, Gabbay YB, Mascarenhas JD, Freitas RB, Oliveira CS, Bellesi N, et al. Immunogenicity, safety and efficacy of tetravalent rhesus-human, reassortant rotavirus vaccine in Belém, Brazil. *Bull World Health Organ*. 1996;74(5):491-50.
- 22 Luz CR, Mascarenhas JD, Gabbay YB, Motta AR, Lima TV, Soares LS, et al. Rotavirus serotypes and electrophoretotypes identified among hospitalized children in São Luís, Maranhão, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2005 Sep-Oct;47(5):287-93.
- 23 Mascarenhas JD, Leite JP, Lima JC, Heinemann MB, Oliveira DS, Araújo IT, et al. Detection of a neonatal human rotavirus strain with VP4 and NSP4 genes of porcine origin. *J Med Microbiol*. 2007 Apr;56(Pt 4):524-32.
- 24 Parashar UD, Gibson CJ, Bresse JS, Glass RI. Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerg Infect Dis*. 2006 Feb;12(2):304-6.

- 25 Parashar UD, Hummelman EG, Bresee JS, Miller MA, Glass RI. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerg Infect Dis.* 2003 May;9(5):565-72.
- 26 Parra GI, Bok K, Martínez V, Russomando G, Gómez J. Molecular characterization and genetic variation of the VP7 gene of human rotaviruses isolated in Paraguay. *J Med Virol.* 2005 Dec;77(4):579-86.
- 27 Pereira HG, Azeredo RS, Leite JP, Barth OM, Suttmoller F, Farias V, et al. Comparison of polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), immuno-electron microscopy (IEM) and enzyme immunoassay (EIA) for the rapid diagnosis of rotavirus infection in children. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1983 Oct-Dec;78(4):483-90.
- 28 Phan TG, Okitsu S, Maneekarn N, Ushijima H. Evidence of intragenic recombination in G1 rotavirus VP7 genes. *J Virol.* 2007 Sep;81(18):10188-94.
- 29 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.
- 30 Santos N, Volotão EM, Soares CC, Campos GS, Sardi SI, Hoshino Y. Predominance of rotavirus genotype G9 during the 1999, 2000, and 2002 seasons among hospitalized children in the city of Salvador, Bahia, Brazil: implications for future vaccine strategies. *J Clin Microbiol.* 2005 Aug;43(8):4064-9.
- 31 Trojnar E, Otto P, Johne R. The first complete genome sequence of a chicken group A rotavirus indicates independent evolution of mammalian and avian strains. *Virology.* 2009 Apr;386(2):325-33.
- 32 Ursu K, Kisfali P, Rigó D, Ivanics E, Erdélyi K, Dán A, et al. Molecular analysis of the VP7 gene of pheasant rotaviruses identifies a new genotype, designated G23. *Arch Virol.* 2009;154(8):1365-9.
- 33 Volotão EM, Soares CC, Maranhão AG, Rocha LN, Hoshino Y, Santos N. Rotavirus surveillance in the city of Rio de Janeiro-Brazil during 2000-2004: detection of unusual strains with G8P[4] or G10P[9] specificities. *J Med Virol.* 2006 Feb;78(2):263-72.

Recebido em / Received / Recibido en: 31/7/2009
Aceito em / Accepted / Aceito en: 25/9/2009