

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

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

Luana da Silva Soares

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

Joana D'Arc Pereira Mascarenhas

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

Rosa Helena Porto Gusmão

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade do Estado do Pará, Belém, Pará, Brazil

Alexandre da Costa Linhares

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

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.

INTRODUÇÃO

O rotavírus do grupo A (RV-A) é o agente etiológico mais comum da gastroenterite severa no mundo, sendo responsável por 40% das infecções por gastroenterite e resultando em 611 mil mortes anuais de recém-nascidos e crianças, especialmente nos países mais pobres. O alcance global desta rotavirose é bem reconhecido; na verdade, todas as crianças apresentam um caso de gastroenterite causada por rotavírus antes dos 5 anos de idade^{7,24,25}.

O rotavírus pertence à família *Reoviridae* e é classificado em sete grupos (A-G) e quatro subgrupos (I, II, I + II, e não-I/II) de acordo com as especificidades dos epítomos na proteína VP6 que constitui o capsídeo interno. O genoma do rotavírus contém 11 segmentos de RNA de fita dupla (dsRNA) dentro do núcleo de um capsídeo de tripla camada. O capsídeo externo é composto de duas proteínas estruturais, VP4 e VP7, que definem os genótipos P (proteína clivada por protease) e G (glicoproteína), respectivamente. Com base na mobilidade dos 11 segmentos em gel de poliacrilamida, os rotavírus podem ser identificados como eletroferotipos longos, curtos ou "supercurtos"¹¹.

Até o presente momento, pelo menos 23 rotavírus do tipo G e 30 do tipo P foram identificados tomando-se por base a análise sequencial dos genes VP7 e VP4, respectivamente. Entretanto, sabe-se que poucos genótipos causam infecção em humanos^{5,6,11,31,32}. Apesar de um grande número de combinações G/P ser teoricamente possível, estudos epidemiológicos no mundo todo têm registrado a circulação de cinco genótipos mais comuns: G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8] e G9P[8]^{6,7,11,19,29}.

Correspondência / Correspondence / Correspondencia:

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

Traduzido por / Translated by / Traducido por:

André Diniz

O genótipo mais prevalente é o G1, que tem sido detectado com taxas de frequências que variam entre 36% e 74% em diferentes regiões do mundo, sendo que as cepas G1P[8] representam aproximadamente 65% de todos os rotavírus identificados²⁹. Castello et al⁶ identificaram cepas de G1P[8] em 40% das infecções por rotavírus na América Latina. Recentemente, Leite et al¹⁹ detectaram cepas de G1 em 43% dos casos durante o período pré-vacinação no Brasil; em contraste, após a introdução de programas de vacinação, a ocorrência deste genótipo reduziu para 3% das infecções por rotavírus, devido à grande predominância das cepas de G2P[4].

A análise sequencial do gene VP7 das cepas do rotavírus humano do tipo G1 na Itália revelou a existência de pelo menos três linhagens genéticas. Estas variantes de antígenos podem ser responsáveis pela circulação contínua do rotavírus do tipo G1². Phan et al²⁸ analisaram o gene VP7 de cepas do rotavírus do tipo G1 coletadas no mundo todo e sugeriram uma nova taxonomia, que inclui 11 linhagens e 17 sublinhagens.

O objetivo do presente estudo foi realizar a caracterização molecular das amostras de rotavírus do tipo G1 obtidas de crianças que participaram de vários estudos anteriormente conduzidos em Belém, Região Norte do Brasil, por um período de 21 anos (de 1982 a 2003).

MATERIAIS E MÉTODOS

PACIENTES E ESPÉCIMES CLÍNICOS

Os espécimes obtidos de cinco estudos sobre gastroenterite viral realizados em Belém, Brasil, entre dezembro de 1982 e outubro de 2003, foram analisados com vistas à detecção de rotavírus^{1,15,20,21}. Dos 798 espécimes positivos para rotavírus por ensaio imunoenzimático (EIA), 330 (41%) apresentavam especificidade G1 quando utilizados anticorpos monoclonais. Para confirmar esse resultado, foram analisadas 148 cepas de rotavírus do tipo G1 por meio da reação em cadeia de polimerase precedida de transcrição reversa (RT-PCR). Esta análise envolveu todas as cepas de G1 detectadas nos Estudos A, B, C e D, e 20% dos casos do Estudo E. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Instituto Evandro Chagas, Secretaria Nacional de Vigilância em Saúde.

EXTRAÇÃO DO RNA

O dsRNA dos rotavírus foi extraído de suspensão fecal a 10% por meio da extração de ácido nucleico com sílica-issoltiocianato de guanidina, conforme descrito por Boom et al³.

ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (PAGE)

O perfil do RNA foi analisado por PAGE com coloração prata, conforme descrito anteriormente^{16,27}.

CARACTERIZAÇÃO DOS GENÓTIPOS G E P DE ROTAVÍRUS POR TRANSCRIPTASE REVERSA SEGUIDA DE REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE (RT-PCR)

O genótipo VP7 foi determinado por transcrição reversa seguida de PCR multiplex, como já descrito na

literatura^{9,14,18}. Dois diferentes grupos de primers específicos foram utilizados para a genotipagem G: pool A, contendo os primers específicos G1 (9T1-1), G2 (9T1-2), G3 (9T-3P), G4 (9T-4) e G9 (9T-B); e pool B, contendo iniciadores específicos para os genótipos G5 (FT5), G6 (DT6), G8 (HT8) e G10 (ET10).

A determinação do genótipo VP4 foi efetuada por meio de RT-PCR seguida de Nested-PCR, conforme descrito por Gentsch et al¹². Em resumo, o gene completo do VP4 foi submetido à transcriptase reversa, e um fragmento do par de base 876 foi amplificado. Foram utilizados primers específicos para os genótipos P[8] (1T-1), P[4] (2T-1), P[6] (3T-1) e P[9] (4T-1).

RESULTADOS

EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DA INFECÇÃO POR ROTAVÍRUS DO TIPO G1

A maior frequência de rotavírus do tipo G1 (68%, 232 de 343) foi encontrada durante um levantamento realizado em 2003 em hospitais pediátricos, enquanto que a menor frequência (11%, 31 de 281) foi verificada durante outro levantamento envolvendo crianças hospitalizadas, realizada entre 1998 e 2000 (Tabela 1). A média de idade das 148 crianças infectadas por G1 foi de 13 meses de idade (entre 2 meses e 3 anos), das quais 70 (47%) tinham < 1 ano, 68 (46%) encontravam-se na faixa entre 1-2 anos e 10 (7%) tinham > 2 anos de idade.

PAGE DE CEPAS DE G1

Os perfis de RNA foram visualizados em 116 (78%) das 148 amostras de G1 testadas. Três diferentes eletroferotipos longos (L1, L2 e L3) foram identificados com base nas diferenças de migração dos segmentos de gene 2, 5 e 10. Quando realizada a comparação do eletroferotipo L1 com o L2, o segmento de gene 2 do L2 migra de forma mais lenta do que o seu correspondente no L1. Já no que se refere ao L3, as diferenças na migração dos segmentos de gene 5 e 10 foram avaliadas em relação ao L1. Outro segmento de gene foi encontrado em uma amostra que apresentava o padrão L1 (Figura 1). O eletroferotipo mais frequente foi o L1 (79%, 92 de 116). O Estudo E forneceu o maior número de amostras aptas a serem submetidas à caracterização por PAGE (96%, 48 de 50).

GENOTIPAGEM G E P

Foram detectadas 147 amostras contendo especificidade para o tipo G1 e uma amostra apresentando uma infecção mista G1+G4. O genótipo P pôde ser determinado em 130 (88%) amostras. O genótipo P[8] foi a especificidade mais frequente no tocante à proteína VP4 (64% dos casos). Além disso, as infecções mistas P[6] + P[8], P[4] + P[8], P[4] + P[6] e P[4] + P[6] + P[8] foram encontradas em 11 (7%), 11 (7%), 3 (2%) e 1 (0.6%) amostras, respectivamente. A tabela 2 apresenta a caracterização de 148 amostras por PAGE e RT-PCR (genes VP4 e VP7). A combinação G1P[8] com o padrão L1 foi responsável por 45% das infecções.

Tabela 1 – Características de estudos sobre rotavírus realizados em Belém, Estado do Pará, Brasil, de 1982 a 2003

| Estudo, título abreviado | Características | Período | Faixa etária | Positivo para RV/amostras coletadas | Frequência de G1 | Referência |
|--|---|----------------------------------|----------------|-------------------------------------|------------------|-------------------------------|
| A, Estudo longitudinal | Em comunidades | Dezembro de 1982 a março de 1986 | 0 – 3 anos | 36/441 (8%) | 25% (9/36) | Linhares ²⁰ (1989) |
| B, Estudo com a RRV-TV | Teste duplo-cego controlado com placebo | Junho de 1990 a junho de 1992 | 1 mês – 2 anos | 90/1990 (4%) | 49% (44/90) | Linhares ²¹ (1996) |
| C, Nosocomial/infecção em comunidade | Hospital | Novembro de 1992 a maio de 1994 | 0 – 5 anos | 48/290 (16%) | 29% (14/48) | Gusmão ¹⁵ (1999) |
| D, Em hospital - vigilância | Hospital | Maio de 1998 a maio de 2000 | 0 – 3 anos | 281/834 (34%) | 11% (31/281) | Gabbay (comunicação) |
| E, Vigilância pré-estudo com a vacina para rotavírus | Hospital | Março a outubro de 2003 | 0 – 5 anos | 343/762 (45%) | 68%* (232/343) | Abate ¹ (2004) |

* 50 amostras foram selecionada para análise.

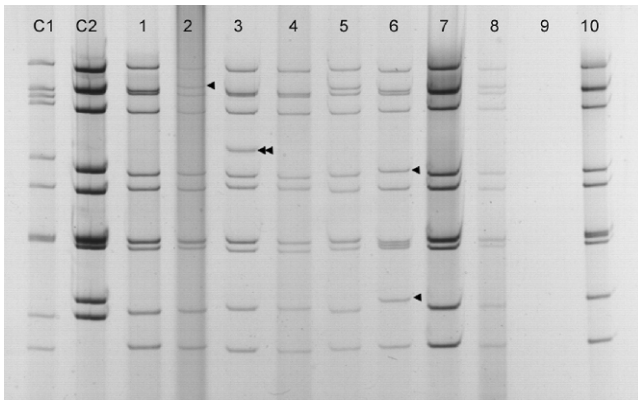


Figura 1 – Eletroforese em gel de poliacrilamida de cepas de rotavírus do tipo G1 identificadas em Belém, Pará, Brasil. C1: Controle, eletroferotipo longo; C2: Controle, eletroferotipo curto; Amostras 1, 3, 4, 7 e 10 – perfil L1 de RNA; Amostras 2, 5 e 8 – perfil L2 de RNA; Amostra 6 – perfil L3 de RNA; Amostra 9 – não caracterizada (◄ grandes diferenças na migração de segmentos dos genes; ◄◄ segmento extra)

Tabela 2 – Eletroferotipos e genótipos P de 148 amostras de rotavírus do tipo G1 coletadas entre 1982 e 2003 em Belém, Pará, Brasil

| Amostras G1 | Eletroferotipos | | | | 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 |

Sinais convencionais utilizados: – Dados numéricos iguais a zero; * NC: não caracterizados por PAGE; [†] NT: não tipado para P.

DISCUSSÃO

O G1 ainda aparenta ser o genótipo mais prevalente, representando cerca de metade das cepas circulantes no mundo todo²⁹. Em países desenvolvidos, o genótipo G1 apresenta as mais altas frequências (70%-73%), enquanto que em países em desenvolvimento, essas taxas parecem ser mais baixas (36%-57%). Essa diferença pode ser atribuídas à circulação mais frequente de cepas incomuns, bem como à emergência de novos tipos nos países mais pobres^{13,29}.

Nesta pesquisa, a cepa de G1 foi detectada em 41% dos casos envolvendo rotavírus durante os 21 anos de estudos usando diferentes abordagens nas populações investigadas. Os resultados aqui apresentados são semelhantes aos de estudos realizados no Rio de Janeiro, onde 50% das amostras obtidas de crianças com diarreia aguda eram do tipo G1³³. Parra et al²⁶ identificaram cepas de G1 em 17% dos casos em uma investigação realizada no Paraguai, entre 1998 e 2000. Esta diferença pode estar relacionada à alta prevalência do G4 e à detecção do G9 naquele estudo.

As taxas de rotavírus do tipo G1 variaram entre 11% e 68% nas pesquisas analisadas. As menores taxas foram observadas no período entre 1998 e 2000. Estes resultados são provavelmente relacionados à alta frequência de cepas não tipadas, bem como à emergência do G9 durante este período. Santos et al³⁰ registraram que 79% de todas as amostras analisadas na cidade de Salvador eram do tipo G9. Resultados semelhantes também foram observados em Goiás, onde Costa et al⁸ detectaram 34% de infecções por rotavírus do tipo G9. Estas descobertas sugerem que a emergência de rotavírus do tipo G9 no Brasil foi seguida de uma grande circulação de cepas com este genótipo.

Ressalte-se que, neste estudo, todas as amostras do tipo G1 apresentaram eletroferotipos longos. Estes perfis de RNA apresentaram três diferentes padrões, o que demonstra a existência de uma grande diversidade de eletroferotipos na região. Todas as variedades foram detectadas nos espécimes dos Estudos B e D, que, por sua

vez, apresentaram uma alta frequência de cepas incomuns e não tipadas (dados não apresentados). Luz et al²² detectaram duas variedades de eletroferotipos longos e 19% dos espécimes do tipo G1 caracterizados por um perfil curto, com três variedades circulando entre crianças diarreicas no Estado do Maranhão.

O G1P[8] já foi considerado em diversos países como o genótipo circulante predominante²⁹. No presente estudo, este genótipo foi detectado em 64% das amostras. Dados semelhantes foram obtidos por Gentsch et al¹³ e Castello et al⁶ em investigações realizadas na América Latina. Esses estudos registraram a ocorrência desta cepa em 52% e 40% das infecções por rotavírus, respectivamente. No Brasil, Carmona et al⁴ detectaram o G1P[8] em 67% dos espécimes coletados em um período de oito anos em São Paulo.

Nesta análise, foi encontrada uma infecção mista envolvendo o genótipo G (G1+G4). Mascarenhas et al²³ analisaram amostras fecais de uma criança recém-nascida hospitalizada com diarreia leve/moderada adquirida em comunidade e observaram a ocorrência da mistura G1 + G4. Kebaabetswe et al¹⁷, em um levantamento realizado em Botsuana envolvendo crianças com gastroenterite,

detectaram as infecções mistas G1+G2, G1+G8 e G1+G3+G9 em 6%, 22% e 6% dos casos, respectivamente.

É importante ressaltar a frequência de infecções mistas envolvendo os rotavírus do tipo G1 (17% dos casos). Das et al¹⁰ documentaram 30% dos casos com infecções mistas em uma investigação com crianças hospitalizadas na Índia, apesar de outras amostras do tipo G terem sido descritas. As maiores taxas de infecções mistas foram detectadas principalmente em países em desenvolvimento, devido provavelmente à ocorrência do rearranjo genético de rotavírus, o que pode levar à emergência de novos rotavírus circulantes dos genótipos G e P e de mutantes de escape.

Ao que sabemos, este é o primeiro estudo a abordar a caracterização molecular do rotavírus do tipo G1 no Brasil. Nossos achados fornecem dados que permitirão uma melhor compreensão a respeito da diversidade molecular associada às infecções por este tipo de rotavírus antes do advento da vacina contra rotavírus. Abordagens mais específicas envolvendo o sequenciamento de nucleotídeos podem ser aplicadas para avaliar a circulação de variedades genéticas do tipo G1 e seu possível impacto sobre estratégias de vacinação.



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.

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

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.



REFERÊNCIAS

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Centers for Disease Control and Prevention. Rotavirus surveillance—worldwide, 2001-2008. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2008 Nov;57(46):1255-7.
- 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.
- 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.
- 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.
- Estes MK, Kapikian AZ. Rotaviruses. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields virology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2007. p. 1917-74.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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 electropherotypes 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, Bresse 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