

Characterization of rotavirus and norovirus strains: a 6-year study (2004-2009)

*Caracterização molecular de cepas de rotavírus e norovírus:
um estudo de 6 anos (2004-2009)*

Audrey Cilli¹, Adriana Luchs¹, Simone G. Morillo¹, Fernanda F. Costa²,
Rita de Cássia C. Carmona³, Maria do Carmo S. T. Timenetsky³

Resumo

Objetivo: Monitorar infecções causadas por rotavírus (RV) e norovírus (NoV) em crianças hospitalizadas ≤ 5 anos com gastroenterite aguda provenientes do estado de São Paulo durante um período de 6 anos (2004-2009).

Métodos: Este estudo retrospectivo foi realizado em 61 centros médicos, utilizando amostras fecais coletadas por conveniência, analisadas por ensaio imunoenzimático, eletroforese em gel de poli(acrilamida), transcrição reversa seguida de reação em cadeia pela polimerase e sequenciamento para caracterização dos genótipos.

Resultados: Infecções por RV e NoV foram detectadas em 29,6% (144/487) e 29,2% (26/89) das amostras, respectivamente. Os genótipos de RV detectados com maior frequência foram: G9P[8] em 2004; G1P[8] em 2005; G9P[8] em 2006; e G2P[4] durante os anos de 2007, 2008 e 2009. A taxa de detecção diminuiu de 36,3% (33/91) em 2004 para 4,2% (4/95) em 2009. NoV pertencente ao genogruppo GII foi encontrado em 61,6% (16/26) das amostras, e GI em 11,5% (3/26). Infecções mistas por NoV e RV foram observadas em 2,2% (2/89) das amostras, envolvendo as cepas GI+G9P[8] e GI+G2P[4].

Conclusões: A distribuição dos genótipos de RV variou com os anos, acompanhada pela redução no número de casos detectados. É necessário intensificar a vigilância pós-implantação da vacina contra RV, visando monitorar as cepas circulantes e sua eficácia contra possíveis genótipos emergentes. Os NoVs têm sido cada vez mais identificados como agentes etiológicos relevantes entre crianças hospitalizadas e exercem um papel importante na etiologia viral da gastroenterite pediátrica aguda no estado de São Paulo.

J Pediatr (Rio J). 2011;87(5):445-9: Norovírus, rotavírus, crianças, gastroenterite, Brasil.

Introdução

Patógenos virais estão entre as causas mais comuns de gastroenterite em comunidades e outras localidades, incluindo instituições semifechadas e hospitais¹. Na infância, o rotavírus (RV) do grupo A é considerado o agente etiológico mais importante de gastroenterite não bacteriana aguda, incluindo

Abstract

Objective: To monitor rotavirus (RV) and norovirus (NoV) infections in hospitalized children ≤ 5 years with acute gastroenteritis in the state of São Paulo, Brazil, during a 6-year period (2004- 2009).

Methods: This retrospective study was conducted with 61 medical centers with convenient surveillance fecal specimens, investigated by enzyme-linked immunosorbent assay, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, reverse polymerase chain reaction and sequencing to genotype characterization.

Results: RV and NoV infections were detected in 29.6% (144/487) and 29.2% (26/89) of the samples, respectively. The most frequent RV genotypes detected were G9P[8] in 2004; G1P[8] in 2005; G9P[8] in 2006; and G2P[4] during 2007, 2008, and 2009. Detection rate declined from 36.3% (33/91) in 2004 to 4.2% (4/95) in 2009. NoV genogroup GII was found in 61.6% (16/26) of the samples, and GI in 11.5% (3/26). Mixed NoV-RV infections were observed in 2.2% (2/89) of the samples, involving GI+G9P[8] and GI+G2P[4] strains.

Conclusions: Genotype distribution varied according to collection year, accompanied by a reduction in detection rate. Use of RV vaccine requires implementation of post-marketing surveillance to monitor RV strain diversity and its efficacy against possible new emerging genotypes. NoVs have been increasingly identified as relevant etiological agents among hospitalized children and play an important role in the viral etiology of pediatric acute gastroenteritis in the state of São Paulo.

J Pediatr (Rio J). 2011;87(5):445-9: Norovirus, rotavirus, children, gastroenteritis, Brazil.

surtos e casos esporádicos, independentemente das melhorias no saneamento básico e procedimentos higiênicos².

Os RV são o principal agente etiológico causador de diarreia aguda em crianças, responsáveis por mais de 600.000 óbitos por ano³, além do significativo impacto econômico causado

1. MSc. Enteric Disease Laboratory, Virology Center, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

2. Public health specialist, Enteric Disease Laboratory, Virology Center, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

3. PhD. Enteric Disease Laboratory, Virology Center, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

Não foram declarados conflitos de interesse associados à publicação deste artigo.

Como citar este artigo: Cilli A, Luchs A, Morillo SG, Costa FF, Carmona RC, Timenetsky MCST. Characterization of rotavirus and norovirus strains: a 6-year study (2004-2009). *J Pediatr (Rio J)*. 2011;87(5):445-9.

Artigo submetido em 07.04.11, aceito em 15.06.11.

doi:10.2223/JPED.2122

pela doença diarreica por RV⁴. No Brasil, as infecções por RV causavam ~ 3,5 milhões de episódios de diarreia, 655.853 consultas ambulatoriais, 92.453 hospitalizações e 850 óbitos de crianças ≤ 5 anos por ano antes da introdução da vacina contra o RV⁵.

Em 2006, uma vacina atenuada G1P[8] foi incluída no Programa Nacional de Imunização, prevenindo a gastroenterite grave por RV e induzindo uma redução significativa na frequência de detecção do RV em crianças com gastroenterite⁶. A eficácia da vacina RIX4414 foi avaliada por Araujo et al., demonstrando 53,9-81,5% de proteção contra casos graves, e 81,2-93% de proteção contra hospitalização devido à gastroenterite causada por RV em crianças⁷.

Recentemente, relatou-se uma alta prevalência de G2P[4] associada a essa vacinação no Brasil⁸, sugerindo que essa vacina monovalente possivelmente criou condições em que o genótipo G2P[4] poderia ter adquirido vantagem seletiva sobre genótipos P[8]. Morillo et al. demonstraram que o genótipo G2P[4] foi a única cepa observada em 2007 durante uma vigilância de genótipos de RV em crianças < 5 anos com gastroenterite aguda provenientes de creches no estado de São Paulo por um período de 5 anos⁹. Entretanto, investigações mais detalhadas sobre a proteção heterológica conferida pela vacina monovalente contra o RV são pontos centrais para entender seu comportamento imunológico^{7,10}.

Os norovírus (NoVs) são a principal causa de gastroenterite não bacteriana aguda em humanos em todo o mundo, responsáveis por 80-90% dos relatos de surtos¹¹. Embora o NoV tenha sido o primeiro vírus claramente associado à gastroenterite aguda, a impossibilidade de cultivá-lo subestimou a importância da infecção por NoV em gastroenterite aguda, e dificultou a realização de estudos epidemiológicos. Dessa forma, a importância do NoV como agente etiológico da gastroenterite aguda tanto em casos esporádicos como em surtos só pôde ser estabelecida após o desenvolvimento de métodos moleculares para a sua detecção^{12,13}.

Em todo o mundo, os surtos de NoV são causados principalmente por cepas pertencentes aos genótipos I (GI) e II (GII), com predominância da cepa GII^{14,15}, inclusive no Brasil^{12,16}. Os NoVs têm sido cada vez mais identificados como agentes etiológicos importantes entre crianças hospitalizadas na Europa, na Ásia e na América. A importância relativa do NoV em gastroenterite aguda deve aumentar como decorrência da vacinação contra o RV¹⁷.

O objetivo deste estudo foi monitorar as infecções por RV e NoV entre crianças hospitalizadas ≤ 5 anos no estado de São Paulo durante um período de 6 anos (2004-2009). A caracterização molecular dos genótipos do NoV e dos genótipos do RV também foi realizada.

Métodos

Este estudo retrospectivo foi conduzido em 61 centros médicos entre o período de 2004 a 2009, com espécimes coletados por conveniência provenientes de crianças hospitalizadas ≤ 5 anos que apresentavam sintomas de gastroenterite aguda. As amostras de fezes dos pacientes com gastroenterite aguda foram enviadas ao Núcleo de Doenças

Entéricas do Instituto Adolfo Lutz, um centro de referência macrorregional para vigilância do RV e membro do Programa de Monitoramento das Doenças Diarreicas Agudas (PMDDA). Este programa tem por objetivo a detecção precoce de surtos de diarreia em todo o país e foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética.

As amostras analisadas eram parte do PMDDA, obtidas a partir de uma amostragem de conveniência, sem critérios de inclusão ou exclusão e sem caracterização dos hospitais participantes. Portanto, o estudo pode não ser representativo do cenário epidemiológico real. Foi realizada a caracterização molecular dos genótipos do RV e dos genótipos do NoV. Não foi incluída avaliação clínica dos pacientes; dessa forma, o estudo não permite avaliar a segurança, imunogenicidade ou proteção oferecida pela vacinação.

Um total de 487 amostras fecais foi testado para RV e NoV usando ensaios imunoenzimáticos comerciais (Premier™ Rotacclone®, Meridian Bioscience Inc., EUA, e Norwalk-like virus®, R-Biopharm AG, Alemanha, respectivamente), realizados de acordo com as instruções do fabricante. Os perfis dos RNA dupla fita (*double-stranded* RNA, dsRNA) dos RVs encontrados nas amostras fecais foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida (*polyacrylamide gel electrophoresis*, PAGE) corado com prata¹⁸.

O RNA fita simples do NoV e o dsRNA do RV foram extraídos com o reagente Trizol® (Invitrogen, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Foi realizada a transcrição reversa seguida de reação em cadeia pela polimerase (*reverse transcriptase polymerase chain reaction*, RT-PCR) para RV e NoV, de acordo com o protocolo previamente descrito^{12,19-21}.

Cinco amostras de RV foram selecionadas para sequenciamento, com a finalidade de obter dados adicionais sobre as sequências de RV e de compreender com mais clareza a variabilidade das cepas brasileiras. Os produtos da RT-PCR do gene VP7 foram purificados com o kit de purificação PureLink™ (Invitrogen, EUA). O sequenciamento foi realizado usando o kit Big Dye™ versão 3.1 (Applied Biosystems, EUA) com *primers* Anti-A1 e RVG9^{19,21}. Os produtos foram analisados em um sequenciador automático [ABI Prism 377 (Applied Biosystems Inc., EUA)] e com o programa DNASTar. As sequências de nucleotídeos foram editadas e alinhadas com o editor de alinhamento de sequências BioEdit.

As sequências foram comparadas com outras sequências disponíveis no banco de dados GenBank. A árvore de distância foi construída utilizando o método Clustal. As sequências determinadas neste estudo foram depositadas no banco de dados GenBank com os seguintes números de acesso: R1114 (HM855236), R1112 (HM855237), R1103 (HM855238), R1102 (HM855239) e R1143 (HM855240).

Resultados

A infecção por RV foi detectada em 144 (29,6%) das 487 espécimes. Com base no padrão de migração no PAGE, uma amostra negativa pelo ensaio imunoenzimático demonstrou perfil típico de RV do grupo C, confirmado por RT-PCR para o gene VP6. A distribuição genotípica do RV mostrou um perfil diferente para cada ano. Os genótipos predominantes foram: G9P[8] (67,8%; 21/31) em 2004, G1P[8] (50%;

14/28) em 2005, G9P[8] (39,5%; 9/23) em 2006, G2P[4] (100%; 16/16) em 2007, G2P[4] (100%; 31/31) em 2008 e G2P[4] (75%; 3/4) em 2009. Foram observadas infecções mistas (G1+G9P[8]) em 2005 e 2006. A taxa de detecção foi reduzida de 36,3% (33/91) em 2004 para 4,2% (4/95) em 2009 (Tabela 1).

A Figura 1 apresenta a relação entre as sequências VP7 deste estudo [uma cepa G1 (R1143), uma cepa G2 (R1114) e três cepas G9 (R1102, R1103, R1112)] com cepas representativas dos genótipos G1 (Wa, M21843), G2 (KO2, AF401754) e G9 (Mc345, D38055). A comparação das sequências G9 mostrou similaridade de 94,6% quando comparadas com Mc345 e similaridade de 99,7% a 100% entre elas. A comparação da sequência G1 mostrou similaridade de 91,2% quando comparada à Wa, e a sequência G2 mostrou similaridade de 98% quando comparada à KO2.

Infecção por NoV foi detectada em 26 (29,2%) das 89 amostras, usando ensaios imunoenzimáticos e/ou de RT-PCR. Dezesesseis (16/26; 61,6%) amostras foram identificadas como NoV pertencentes ao genogrupo GII, sete (7/26; 26,9%) como GI, e três (3/26, 11,5%) como GI+GII. Foram detectadas infecções mistas por NoV e RV em 2,2% (2/89), envolvendo as cepas GI+G9P[8] e GI+G2P[4].

Discussão

O RV é um dos principais agentes causadores de gastroenterite pediátrica em todo o mundo; no entanto, com a melhoria nas técnicas de diagnóstico molecular, a importância

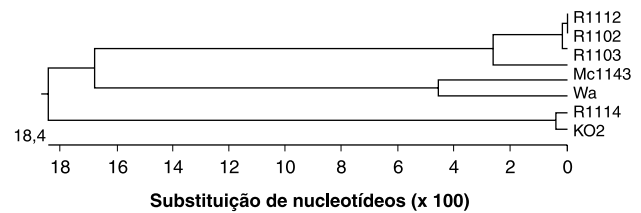


Figura 1 - Dendrograma indicando a similaridade das sequências de nucleotídeos de cepas de rotavírus humanos dos genótipos G1 (R1143), G2 (R1114) e G9 (R1112, R1102, R1103) em crianças ≤ 5 anos com gastroenterite provenientes de centros médicos do estado de São Paulo, comparadas com amostras Wa (G1), KO2 (G2) e Mc345 (G9) retiradas do GenBank. A escala indica o número de resíduos de nucleotídeos divergentes

do NoV está se tornando mais evidente, e a detecção desses vírus associado à gastroenterite continua a aumentar⁸. Neste estudo, RVs e NoVs apresentaram uma associação similar em crianças com gastroenterite que exigem hospitalização; contudo, relatos semelhantes geralmente demonstram que o NoV é a segunda causa de hospitalização, após RV^{14,15}.

Os RVs com genótipo G9 e G1 foram os mais frequentes em circulação entre 2004 e 2006, correspondendo aos resultados de diversos relatos anteriores que estudaram a distribuição dos genótipos G de RV em diversos países, incluindo o Brasil^{9,22-25}. Os genes VP7 das cepas G9 demonstraram identidade, indicando que os genes VP7 possuem uma linhagem ancestral comum.

Tabela 1 - Resultados da genotipagem do RV em crianças ≤ 5 anos com gastroenterite provenientes de centros médicos do estado de São Paulo, Brasil, 2004-2009

Genótipo do RV	Ano					
	2004 % (n)	2005 % (n)	2006 % (n)	2007 % (n)	2008 % (n)	2009 % (n)
G1P[4]	-	-	4,3 (1/23)	-	-	-
G1P[8]	29 (9/31)	50 (14/28)	13 (3/23)	-	-	-
G2P[4]	-	3,6 (1/28)	26 (6/23)	100 (16/16)	100 (31/31)	75 (3/4)
G3P[8]	-	-	4,3 (1/23)	-	-	-
G4P[4]	3,2 (1/31)	-	-	-	-	-
G9P[4]	-	3,6 (1/28)	4,3 (1/23)	-	-	-
G9P[8]	67,8 (21/31)	39,2 (11/28)	39,5 (9/23)	-	-	25 (1/4)
G1+G9P[8]	-	3,6 (1/28)	4,3 (1/23)	-	-	-
GNTp[8]	-	-	4,3 (1/23)	-	-	-
Total de amostras genotipadas	34,1 (31/91)	36,8 (28/76)	41,8 (23/55)	27,6 (16/58)	27,7 (31/112)	4,2 (4/95)
PCR negativa	6,1 (2/33)	9,7 (3/31)	8 (2/25)	11,1 (2/18)	6,1 (2/33)	-
Total de ELISA positivo para RV	36,3 (33/91)	42,1 (31/76)	45,5 (25/55)	31 (18/58)	29,5 (33/112)	4,2 (4/95)
RV do grupo C	-	-	-	-	0,9 (1/112)	-
Total de amostras	91	76	55	58	112	95

NT = rotavírus não tipado; PCR = reação em cadeia pela polimerase (*polymerase chain reaction*); RV = rotavírus.

A detecção de G2 começou a aumentar em 2006, e esse genótipo tomou o lugar de G1 e G9 como o mais prevalente nos anos de 2007, 2008 e 2009. Recentemente, foi relatada uma alta prevalência de G2P[4] no Brasil associada ao programa de vacinação universal contra RV que utiliza uma vacina oral com o vírus RV G1P[8] atenuado^{8,26}, sugerindo que essa vacina monovalente possivelmente criou condições em que o G2P[4] poderia ter adquirido uma vantagem seletiva sobre genótipos P[8]. No entanto, uma periodicidade temporal, dentro de um padrão cíclico do G2P[4] de ~ 10 anos, foi observada no Brasil²², e deve ser considerada como uma explicação alternativa para o aumento na taxa de detecção desse genótipo desde 2006. O genótipo G2P[4] também foi a cepa mais prevalente de RV detectado em 2007 no noroeste de Portugal, uma população que não havia recebido vacina contra RV²⁷, assim como em outros estudos conduzidos em populações não vacinadas^{28,29}.

Quanto aos períodos pré e pós-vacinação, as mudanças na distribuição de genótipos encontradas são acompanhadas por uma redução na taxa de detecção de RV. Essa redução foi observada no número de surtos por RV notificados no estado de São Paulo, que diminuiu progressivamente de 35 (10.481 casos) em 2004; 24 (3.144 casos) em 2005; 35 (2.084 casos) em 2006; oito (164 casos) em 2007; um (três casos) em 2008; para nenhum em 2009³⁰.

A frequência da infecção por NoV em crianças detectada neste trabalho (29,2%) foi mais baixa do que a observada em um estudo realizado na Alemanha (35%), mas é semelhante à frequência encontrada na Finlândia durante os anos de 2001 e 2002 (29%)¹⁴. Estudos prévios conduzidos em diferentes estados do Brasil demonstraram que a prevalência do NoV entre crianças hospitalizadas varia de 9 a 36%^{11,31-33}.

Os dados sobre pacientes pediátricos hospitalizados na Itália³⁴, na Alemanha¹⁴ e no Brasil^{2,33} demonstraram a prevalência do NoV do genótipo GII. Este estudo revelou uma preponderância do GII, confirmando que esse genótipo específico é o mais frequentemente associado a doenças causadas por NoV em todo o mundo, em comparação com o GI^{12,14}. As consequências epidemiológicas desse achado ainda não estão claras; estudos sobre as possíveis diferenças nas propriedades biológicas, tais como virulência, vias de transmissão, estabilidade do vírus no ambiente devem fornecer explicações sobre o tema¹⁴.

Neste estudo, ocorreram coinfeções entre NoV GI e RV G9/G2. Infecções duplas envolvendo vírus entéricos são relativamente comuns em casos de gastroenterite aguda, o que indica um alto índice de exposição a uma variedade de patógenos entéricos¹⁴. No entanto, existem poucos relatos disponíveis sobre coinfeção por NoV e RV: 1% no Japão¹⁵, 2,1% na Alemanha¹⁴, e 1,9% na Itália³⁴. No Brasil, Victoria et al. relataram um índice de 4% de infecção dupla devido a RV e NoV em crianças hospitalizadas no estado do Rio de Janeiro³³. Considerando-se a diversidade de vírus e genótipos circulantes nas comunidades, esperava-se encontrar números mais elevados de infecções mistas; contudo, essas taxas parecem ser menores na população brasileira.

A introdução da vacina contra RV foi provavelmente o fato que mais influenciou a tendência de redução nas hospi-

talizações por gastroenterite desde 2006³⁵. A frequência da infecção por NoV indica que o NoV é um fator importante na etiologia viral da gastroenterite pediátrica aguda no estado de São Paulo. Um melhor entendimento da epidemiologia das infecções por NoV será necessário para avaliar o papel dessas infecções entre as crianças brasileiras e monitorar o impacto do programa de vacinação contra RV.

Referências

- Vernacchio L, Vezina RM, Mitchell AA, Lesko SM, Plaut AG, Acheson DW. *Diarrhea in American and young children in the community setting: incidence, clinical presentation and microbiology*. *Pediatr Infect Dis J*. 2006;25:2-7.
- Xavier MP, Oliveira SA, Ferreira MS, Victoria M, Miranda V, Silva MF, et al. *Detection of calicivirus associated with acute infantile gastroenteritis in Salvador, an urban center in Northeast Brazil*. *Braz J Med Biol Res*. 2009;42:438-44.
- Parashar UD, Gibson CJ, Bresse JS, Glass RI. *Rotavirus and severe childhood diarrhea*. *Emerg Infect Dis*. 2006;12:304-6.
- Afonso A, Antunes H. *Infecção por rotavírus: implicações e custos*. *Acta Pediatr Port*. 2007;38:138-43.
- 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.
- Gurgel RQ, Correia JB, Cuevas LE. *Effect of rotavirus vaccination on circulating virus strains*. *Lancet*. 2008;371:301-2.
- Araujo EC, Clemens SA, Oliveira CS, Justino MC, Rubio P, Gabbay YB, et al. *Safety, immunogenicity, and protective efficacy of two doses of RIX4414 live attenuated human rotavirus vaccine in healthy infants*. *J Pediatr (Rio J)*. 2007;83:217-24.
- Nakagomi T, Cuervas LE, Gurgel RG, Elrokshi 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;153:591-3.
- Morillo SG, Luchs A, Cilli A, Costa FF, Carmona R de C, Timenetsky M do C. *Characterization of rotavirus strains from day care centers: pre- and post-rotavirus vaccine era*. *J Pediatr (Rio J)*. 2010;86:155-8.
- Bernstein DI. *RIX4414 (Rotarix): a live attenuated human rotavirus vaccine*. *J Pediatr (Rio J)*. 2007;83:193-5.
- Kirkwood CD, Bishop RF. *Molecular detection of human Calicivirus in young children hospitalized with acute gastroenteritis in Melbourne, Australia, during 1999*. *J Clin Microbiol*. 2001;39:2722-4.
- Morillo SG, Cilli A, Carmona R de C, Timenetsky M do C. *Identification and molecular characterization of norovirus in São Paulo State, Brazil*. *Braz J Microbiol*. 2008;39:619-22.
- Morillo SG, Luchs A, Cilli A, Ribeiro CD, Calux SJ, Carmona R de C, Timenetsky M do C. *Norovirus 3rd Generation kit: an improvement for rapid diagnosis of sporadic gastroenteritis cases and valuable for outbreak detection*. *J Virol Methods*. 2011;173:13-6.
- Oh DY, Gaedicke G, Schreier E. *Viral agents of acute gastroenteritis in German children: prevalence and molecular diversity*. *J Med Virol*. 2003;71:82-93.
- Nakanishi K, Tsugawa T, Honma S, Nakata S, Tatsumi M, Yoto Y, et al. *Detection of enteric viruses in rectal swabs from children with acute gastroenteritis attending the pediatric outpatient clinics in Sapporo, Japan*. *J Clin Virol*. 2009;46:94-7.
- Morillo SG, Luchs A, Cilli A, Ribeiro CD, Calux SJ, Carmona R de C, et al. *Large gastroenteritis outbreak due to norovirus GII in São Paulo, Brazil, summer 2010*. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2011;53:119-20.
- Junquera CG, de Baranda CS, Mialdea OG, Serrano EB, Sánchez-Fauquier A. *Prevalence and clinical characteristics of norovirus gastroenteritis among hospitalized children in Spain*. *Pediatr Infect Dis J*. 2009;28:604-7.

18. Pereira HG, Azevedo RS, Leite JP, Barth OM, Suttmoller F, de 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;78:483-90.
19. Timenetsky Mdo C, Gouvea V, Santos N, Carmona RC, Hoshino Y. A novel human rotavirus serotype with dual G5-G11 specificity. *J Gen Virol.* 1997;78:1373-8.
20. Gouvea V, Allen JR, Glass RI, Fang ZY, Bremont M, Cohen J, et al. Detection of group B and C rotaviruses by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1991;29:519-23.
21. 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;30:1365-73.
22. Carvalho-Costa FA, Assis RM, Fialho AM, Bóia MN, Alves DP, Martins CM, et al. Detection and molecular characterization of group A rotavirus from hospitalized children in Rio de Janeiro, Brazil, 2004. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2006;101:291-4.
23. Bányai K, Gentsch JR, Schipp R, Jakab F, Meleg E, Mihály I, et al. Dominating prevalence of P[8], G1 and P[8], G9 rotavirus strains among children admitted to hospital between 2000 and 2003 in Budapest, Hungary. *J Med Virol.* 2005;76:414-23.
24. Carmona RC, Timenetsky Mdo C, Morillo SG, Richtzenhain LJ. Human rotavirus serotype G9, São Paulo, Brazil, 1996-2003. *Emerg Infect Dis.* 2006;12:963-8.
25. Nunes AA, de Mello LM, Parrode RN, Bittar JP, Domingues AL. Prevalence of rotavirus in acute diarrhea and its association with clinical signs and symptoms. *J Trop Pediatr.* 2010;56:212-3.
26. Timenetsky M do C, Carmona R de C, Luchs A, Russo DH, Morillo S, Cilli A, et al. Prevalence of rotavirus genotype G2P4 in Brazil after the rotavirus vaccine introduction. *American Society for Virology. 27th Annual Meeting. Cornell University. New York: Ithaca; 2008, 263 p.*
27. Antunes H, Afonso A, Iturriza M, Martinho I, Ribeiro C, Rocha S, et al. G2P[4] the most prevalent rotavirus genotype in 2007 winter season in an European non-vaccinated population. *J Clin Virol.* 2009;45:76-8.
28. Desselberger U, Wolleswinkel-van den Bosch J, Mrukowicz J, Rodrigo C, Giaquinto C, Vesikari T. Rotavirus types in Europe and their significance for vaccination. *Pediatr Infect Dis J.* 2006;25: S30-41.
29. Ferrera A, Quan D, Espinoza F. Increased prevalence of genotype G2P(4) among children with rotavirus-associated gastroenteritis in Honduras. 17th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases ICC; 2007 Mar 31-Apr 04; Munich. Hoboken (NJ): Wiley-Blackwell; 2007.
30. CVE [Internet]. São Paulo: Centro de Vigilância Epidemiológica. Available from: http://www.cve.saude.sp.gov.br/hm/hidrica/hidri_estat.html. Acesso: 20/03/2011.
31. Castilho JG, Munford V, Resque HR, Fagundes-Neto U, Vinjé J, Rácz ML. Genetic diversity of norovirus among children with gastroenteritis in São Paulo State, Brazil. *J Clin Microbiol.* 2006;44:3947-53.
32. Borges AM, Teixeira JM, Costa PS, Giugliano LG, Fiaccadori FS, Franco Rde C, et al. Detection of calicivirus from fecal samples from children with acute gastroenteritis in the West Central region of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2006;101:721-4.
33. Victoria M, Carvalho-Costa FA, Heinemann MB, Leite JP, Miagostovich M. Prevalence and molecular epidemiology of noroviruses in hospitalized children with acute gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil, 2004. *Pediatr Infect Dis J.* 2007;26:602-6.
34. Soares CC, Santos N, Beard RS, Albuquerque MC, Maranhão AG, Rocha LN, et al. Norovirus detection and genotyping for children with gastroenteritis, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2007;13:1244-6.
35. Lanzieri TM, Costa I, Shafi FA, Cunha MH, Ortega-Barria E, Linhares AC, 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;29:673-5.

Correspondência:

Audrey Cilli, Maria do Carmo Sampaio Tavares Timenetsky
 Instituto Adolfo Lutz, Centro de Virologia, Núcleo de Doenças
 Entéricas
 Av. Dr. Arnaldo, 355
 CEP 01246-902 - São Paulo, SP
 Tel.: (11) 3068.2909
 Fax: (11) 3088.3753
 E-mail: audreycilli@gmail.com, timenetsky.m@gmail.com