



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

THAIS NERIS DA SILVA MEDEIROS

**ANÁLISE DO GENOMA COMPLETO DE ROTAVÍRUS G6P[5]
ISOLADO EM UM SURTO DE DIARREIA NEONATAL EM
REBANHO BOVINO DE CORTE VACINADO**

THAIS NERIS DA SILVA MEDEIROS

**ANÁLISE DO GENOMA COMPLETO DE ROTAVÍRUS G6P[5]
ISOLADO EM UM SURTO DE DIARREIA NEONATAL EM
REBANHO BOVINO DE CORTE VACINADO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (Área de Concentração: Sanidade Animal) da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Alice Fernandes Alfieri

Londrina
2012

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

M488a Medeiros, Thais Neris da Silva.
Análise do genoma completo de rotavírus G6P[5] isolado em um surto de diarreia neonatal em rebanho bovino de corte vacinado / Thais Neris da Silva Medeiros. - Londrina, 2012.
xvii, 117f. : il.

Orientador: Alice Fernandes Alfieri.
Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2012.
inclui bibliografia.

1. Diarreia em bovino - Teses. 2. Rotavírus - Bovino de corte - Teses. 3. Bovino de corte - Doenças - Teses. 4. Víruses em animais - Teses. 5. Virologia veterinária - Teses. i. Alfieri, Alice Fernandes. ii. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. iii. Título.

CDU 619:636.2

THAIS NERIS DA SILVA MEDEIROS

**ANÁLISE DO GENOMA COMPLETO DE ROTAVÍRUS G6P[5]
ISOLADO EM UM SURTO DE DIARREIA NEONATAL EM REBANHO
BOVINO DE CORTE VACINADO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (Área de Concentração: Sanidade Animal) da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

BANCA EXAMINADORA

Prof^l. Dr³. Elisabete Takiuchi
UFPR – Palotina – PR

Prof. Dr. Marco Antônio Bacellar Barreiros
UFPR – Palotina – PR

Prof^l. Df. Alice Fernandes Alfieri
UEL – Londrina – PR

Londrina, 20 de Abril de 2012.

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Virologia Animal, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (Área de Concentração: Sanidade Animal), sob orientação da ProP. Dr^a. Alice Fernandes Alfieri.

Os recursos financeiros para o desenvolvimento do projeto foram obtidos junto às agências e órgãos de fomento à pesquisa, abaixo relacionados:

- 1 CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico / MCT**
- 2 CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior / MEC**
- 3 FAP/PR: Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná / SETI**
- 4 FINEP: Financiadora de Estudos e Projetos / MCT**

A Deus

Aos meus avós maternos Jorge Antônio da Silva (*in memoriam*) e Maria Neris da Silva, Aos meus avós paternos José de Medeiros e Maria Gasparin de Medeiros, meus pais Lindamir Neris da Silva e Carlos Augusto de Medeiros, a meu noivo Diogo Kazuya Cavaguchi, aos meus filhotes Julieta, Suzi e Ariel.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela oportunidade de estar aqui hoje em constante aprendizado e aprimoramento, por sua sabedoria e misericórdia.

A minha família, por ter me proporcionado todo apoio e acreditarem em mim. Pela minha avó, com toda benevolência, por ser uma pessoa íntegra e mais pura que eu conheço e tenho a oportunidade de estar em diária convivência desde que nasci. A minha mãe que me deu todas as referências e é minha melhor amiga. Sem ela não estaria aqui hoje. Ao meu pai, que também me apoiou.

À professora e orientadora Df. Alice, por acreditar em mim, me acolher e me dar à melhor oportunidade em um lugar para poder crescer e aprender. Com o serviço voluntário e posteriormente o mestrado no Laboratório de Virologia, me ajudou com todas as portas abertas. A professora sempre foi uma referência para mim, antes como professora na graduação e posteriormente após conhecê-la um pouco mais, como profissional, esposa e mãe.

Ao professor Dr. Amauri, também pela oportunidade, dedicação ao trabalho e aos alunos e sabedoria transmitidas. A ele minha admiração e respeito.

À professora Df Michele Lunardi, que aceitou participar da banca de qualificação, e também por ter convivido durante todo o mestrado, me auxiliando sempre que necessário.

À professora Df Elisabete Takiuchi e ao professor Dr. Marco Antônio Bacellar Barreiros, por terem aceitado prontamente participar da defesa pública da dissertação e por contribuírem com o seu conhecimento.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, pela formação acadêmica.

À secretária Helenice, pelas muitas ajudas, e a todos os funcionários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva.

Aos funcionários do laboratório. Dalíria *in memorian*, pela sua amizade e sabedoria transmitidas. Kerlei, pelos ensinamentos e amizade. Maria e Juliana por todo auxílio no laboratório e para realização do projeto de pesquisa.

À Elis, que me ensinou muito sobre rotavírus e biologia molecular, agradeço pelo seu tempo e sua constante ajuda. À Cecília agradeço por nossas aulas de música, dança e momentos de descontração. À Aline, que desde o momento em que cheguei ao laboratório me acolheu, me ensinando tudo da maneira mais correta, por sua paciência e dedicação ao trabalho. À Juliane e Raquel, por sua amizade.

Aos amigos de laboratório Ana, Claudia, Danilo, Flávia, Lívia, Michele, Noemi, Patrícia, Rodrigo, Vilma, Vitor, Wagner e aos estagiários.

Ao professor Milton Yamamura, pelas conversas, conselhos e por acreditar no meu potencial. É uma pessoa iluminada e admirável.

Ao meu noivo Diogo, que nunca deixou de acreditar em mim, pelo apoio e carinho. A todos que contribuíram para a realização deste sonho. Muito obrigada.

"A certeza de que estamos sempre começando, a certeza de que é preciso continuar, e a certeza de que podemos ser interrompidos antes de continuarmos.

Fazer da interrupção um caminho novo, da queda um passo de dança, do medo uma escada, do sonho uma ponte, da procura um encontro."

Fernando Sabino.

MEDEIROS, Thais Neris da Silva. **Análise do genoma completo de rotavírus G6P[5] isolado em um surto de diarreia neonatal em rebanho bovino de corte vacinado.** 2012. 117f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal, Área de Concentração: Sanidade Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2012.

RESUMO

O rotavírus bovino grupo A (BoRV-A) é um dos mais importantes agentes etiológicos de diarreia neonatal em bezerros, causando importantes perdas econômicas à pecuária bovina de todo o mundo. O objetivo deste estudo foi caracterizar molecularmente o BoRV-A isolado em um surto de diarreia neonatal em um rebanho bovino de corte de criação extensiva proveniente do estado do Mato Grosso do Sul, região Centro-Oeste do Brasil. O rebanho era regularmente vacinado contra a diarreia neonatal com vacina comercial inativada contendo o BoRV-A genótipos G6P[1] (NCDV-Lincoln) e G10P[11] (B223), além de outros enteropatógenos, de acordo com instruções do fabricante. Trinta e uma amostras de fezes diarreicas de bezerros, com até 30 dias de idade, foram avaliadas quanto à presença de BoRV-A por meio da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida corado com nitrato de prata (ss-PAGE). Em 19 (61,9%) amostras foi possível a identificação de BoRV-A por ss-PAGE. Destas, 17 foram positivas em RT-PCR com *primers* consensuais para os genes VP7 e VP4 de rotavírus grupo A. Uma amostra positiva em ss-PAGE e RT-PCR foi isolada em células MA-104. Os produtos consensuais dos genes VP4 e VP7 amplificados em 12 amostras foram selecionados para a identificação dos genes G e P por meio de reação de sequenciamento e em todos foi possível a identificação do genótipo G6P[5]. Uma amostra fecal foi selecionada para a caracterização molecular das proteínas VP1-VP3, VP6, NSP1-NSP5/6 do RV-A e a análise de nucleotídeos (nt) revelou que a cepa de BoRV-A pertencia aos genótipos G6-P[5]-I2c-R2-C2-M2-A3-N2-T6-E2e-H3a. Na árvore filogenética para o gene VP7, as sequências foram agrupadas em um cluster diferente da linhagem G6-IV quando comparadas com as sequências dos protótipos UK (G6P[5]) e NCDV-Lincoln (G6P[1]) e, com isso, foi proposta a sua classificação em uma nova sublinhagem, tentativamente denominada de G6-IV-e. As sequências do gene VP4, mesmo apresentando maior homologia com a cepa UK, agruparam em um cluster diferente dos protótipos P[5]. Em resumo, com exceção do gene da proteína VP4, a amostra de BoRV-A incluída nesse estudo partilhou os mesmos genótipos e linhagens para todos os genes analisados com o protótipo NCDV-Lincoln, presente nas vacinas comerciais. Esse resultado ratifica a importância da indução de imunidade homotípica, relativa ao genótipo da proteína VP4 do BoRV-A, no desenvolvimento de resistência à infecção e de quadros clínicos de diarreia neonatal em rebanhos bovinos regularmente vacinados contra a rotavirose.

Palavras-chave: Bezerros. Diarréia. BoRV-A. Genotipagem. Vacina.

MEDEIROS, Thais Neris da Silva. **Full genomic analysis of G6P[5] rotavirus strain isolated from a neonatal diarrhea outbreak in a vaccinated Brazilian beef cattle herd.**

2012. 117p. Dissertation (Master's Degree in Animal Science) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2012.

ABSTRACT

The bovine rotavirus group A (BoRV-A) is one of the most important etiologic agents of neonatal diarrhea in calves, causing important economic losses to the cattle worldwide. The aim of this study was carry out molecular characterization the BoRV-A isolated from an neonatal diarrhea outbreak in a beef cattle herd with extensive breeding from Mato Grosso do Sul state, Midwest Brazil. The herd was regularly vaccinated against neonatal diarrhea with inactivated commercial vaccine containing BoRV-A genotypes G6P[1] (NCDV-Lincoln) and G10P[11] (B223), and other pathogens, according to manufacturer's instructions. Thirty-one diarrheic fecal samples from calves aged less than 30 days old, were evaluated for the presence of BoRV-A by the technique of silver-stained polyacrylamide gel electrophoresis (ss-PAGE). In 19 (61.9%) samples was possible to identify BoRV-A by ss-PAGE. Of these, 17 were positive by RT-PCR with consensus primers for VP4 and VP7 genes of rotavirus group A. A positive sample in ss-PAGE and RT-PCR was isolated on MA-104 cells. Consensus products of VP4 and VP7 genes amplified in 12 samples were selected for the identification of P and G genes by sequencing reaction and in all cases was possible to identify the G6P[5] genotype. One fecal sample was selected for molecular characterization of the VP1-VP3, VP6, NSP1-NSP5/6 genes of RV-A and analysis of nucleotide (nt) revealed that the strain belonged to BoRV-A genotypes G6-P[5]-I2c-R2-C2-A3-M2-N2-T6-E2e-H3A. In the phylogenetic tree for the VP7 gene, the sequences were grouped into a cluster different from the strain G6-IV when compared with the sequences of prototypes UK (G6P[5]) and NCDV-Lincoln (G6P[1]) and, therefore, was proposed to classify them in a new sublineage, tentatively designed G6-IV-e. Although the VP4 gene sequences have the highest homologies with the UK strain, they grouped in a cluster different than the P[5] prototype. In summary, with the exception of the VP4 gene, the BoRV-A sample included in this study shared the same genotypes and lineages for all genes analyzed with the prototype NCDV-Lincoln, present in commercial vaccines. This result confirms the importance of induction of homotypic immunity on the genotype VP4 of the BoRV-A in the development of resistance to infection and clinical signs of neonatal diarrhea in cattle regularly vaccinated against rotaviruses.

Keywords: Calves. Diarrhea. BoRV-A. Genotyping. Vaccine.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

- Fig.1** – Rotavirus com três camadas proteicas concêntricas que constituem o triplo capsídeo viral (camada externa, intermediária e interna), evidenciando a localização das proteínas estruturais19
- Fig.2** – Eletroforese em gel de poliacrilamida do genoma do rotavirus, RNA fita dupla, segmentado e as proteínas codificadas por cada segmento genômico. Partícula de rotavirus determinada esquematicamente19
- Fig.3** – Árvore filogenética baseada em sequências com 950nt (58-1007 nt) do gene VP7 do RV-A pertencentes aos protótipos das linhagens do genotipo G6, utilizando o método de *neighbor-joining* e o modelo de *Kimura two-parameter*27
- Fig.4** – Árvore filogenética baseada em sequências com 877 nt (11-887 nt) do gene VP4 do RV-A pertencentes aos protótipos do genotipo P[5], utilizando o método de *neighbor-joining* e o modelo de *Kimura two-parameter*29
- Fig.5** – Árvore filogenética baseada em sequências com 650 nt (29-679 nt) do gene NSP4 do RV-A pertencentes aos protótipos do genotipo E2, utilizando o método de *neighbor-joining* e o modelo de *Kimura two-parameter*31
- Fig.6** – Árvore filogenética baseada em sequências com 597 nt (20-618 nt) do gene NSP5/6 do RV-A pertencentes aos protótipos do genotipo H3, utilizando o método de *neighbor-joining* e o modelo de *Kimura two-parameter*32
- Fig.7** – Árvore filogenética baseada em sequências com 235 nt (873-1007 nt) do gene VP6 do RV-A pertencentes aos protótipos do genotipo I2, utilizando o método de *neighbor-joining* e o modelo de *Kimura two-parameter*33

FULL GENOMIC ANALYSIS OF G6P[5] ROTAVIRUS STRAIN ISOLATED IN A NEONATAL DIARRHEA OUTBREAK IN A VACCINATED BRAZILIAN BEEF CATTLE HERD

- Fig.1** – Phylogenetic tree with 926 bp amplicon (nt 60-985) of the VP7 gene of G6 genotype with Brazilian BoRV-A strains60
- Fig.2** – Phylogenetic tree with 691 bp amplicon (nt 46-736) of the VP4 gene the P[5] genotype with Brazilian BoRV-A strains61

LISTA DE QUADROS

REVISÃO DE LITERATURA

Quadro 1 – Funções atribuídas às proteínas codificadas pelos segmentos genômicos do rotavírus.....	22
Quadro 2 – Cepas de rotavírus grupo A de origem humana e animal das linhagens e sublinhagens do genotipo G6 (VP7)	28
Quadro 3 – Funções atribuídas às proteínas codificadas pelos segmentos genômicos do rotavírus e a porcentagem de identidade de nt para cada gene (valor de corte).....	30

LISTA DE TABELAS

ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

Table 1 – The prototypes of higher nucleotide identity with BoRV-A strain, their respective genes, and genotypes are showed	36
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

aa	aminoácido
bp	<i>base pair</i> (pares de base)
dsRNA	RNA <i>double-stranded</i> (dupla fita)
BoRV-A	rotavirus bovino sorogrupo A
EGPA	eletroforese em gel de poliacrilamida
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> (teste imunoenzimático)
Fig	figura
Ig	imunoglobulina
kDa	kilodaltons
MA-104	células renais de macaco <i>rhesus</i>
NCDV	Lincoln - <i>neonatal calf diarrhea virus</i> (virus da diarreia neonatal de bezerros)
NSP	<i>non structural protein</i> (proteínas não-estruturais)
nt	nucleotídeos
ORF	<i>open reading frame</i> (sequência aberta de leitura)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (reação em cadeia da polimerase)
RT	<i>reverse transcription</i> (transcrição reversa)
RV	rotavirus
RV-A	rotavirus sorogrupo A
RV-B	rotavirus sorogrupo B
RV-C	rotavirus sorogrupo C
ss-PAGE	<i>silver-stained polyacrylamide gel electrophoresis</i>
VP	<i>viral protein</i> (proteína viral)

SUMÁRIO

1 REVISÃO DE LITERATURA	17
1.1 INTRODUÇÃO	17
1.2 DIARREIAS NEONATAIS	17
1.3 ROTAVIRUS	18
1.4 ROTAVIRUS BOVINO SOROGRUPO A (RV-A)	22
1.5 SOROTIPOS P (VP4) E G (VP7) DE BoRV-A	24
1.6 GENOTIPOS P (VP4) E G (VP7) DE BoRV-A	24
1.7 GENOTIPO G6 (VP7)	25
1.8 LINHAGENS DO GENOTIPO G6 (VP7)	26
1.9 GENOTIPO P[5] (VP4)	29
1.10 NOVA CLASSIFICAÇÃO DO RV-A: GENOTIPOS I (VP1), R (VP2), C (VP3), M (VP6), A (NSP1) N (NSP2), T (NSP3), E (NSP4) E H (NSP5/6)	30
1.11 LINHAGENS DO GENOTIPO E2 (NSP4)	30
1.12 LINHAGENS DO GENOTIPO H3 (NSP5/6)	31
1.13 LINHAGENS DO GENOTIPO I2 (VP6)	32
1.14 POTENCIAL ZONÓTICO DO ROTAVIRUS	33
1.15 VACINAS E FALHAS VACINAIS	35
1.16 DIAGNÓSTICO	37
1.16.1 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida	38
1.16.2 ELISA Direto	38
1.16.3 RT-PCR	38
1.16.4 Genotipagem pela Multiplex-Nested-Pcr	38
1.16.5 Sequenciamento e Análise Filogenética	39
1.16.6 Isolamento Viral em Cultivo Celular	39
1.17 RELEVÂNCIA DO ESTUDO	39
1.18 REFERÊNCIAS	40
2 OBJETIVOS	48
2.1 OBJETIVO GERAL	48
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	48

3 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO	49
3.1 ABSTRACT	49
3.2 INTRODUCTION	50
3.3 MATERIALS AND METHODS	51
3.3.1 Herd and Stool Samples	51
3.3.2 dsRNA Extraction	52
3.3.3 ss-PAGE	52
3.3.4 RT-PCR Assay of VP4 and VP7 Genes	52
3.3.5 Multiplex-Nested-PCR	53
3.3.6 RT-PCR Assay for VP1-VP3, VP6, and NSP2-NSP5/6 Genes	53
3.3.7 Analysis of PCR Products	53
3.3.8 Sequencing Analysis	53
3.3.9 Isolation in Cell Culture	54
3.4 RESULTS	55
3.5 DISCUSSION	56
3.6 REFERENCES	61
4 CONCLUSÕES	67
ANEXOS	68
A – Lista de reagentes	69
B – Protocolo de técnicas	75
C – Soluções e tampões	88
D – Lista de Software	101
APÊNDICE	102
A – Árvore filogenética baseada na sequência parcial com 960 nt (63-1022 nt) da proteína VP7 de RV-A pertencentes aos genótipos G descritos	103
B – Árvore filogenética baseada na sequência parcial com 721 nt (47-767 nt) da proteína VP4 de RV-A pertencentes aos genótipos P descritos	104
C – Árvore filogenética baseada na sequência parcial com 325 nt (784-1008 nt) da proteína VP6 de RV-A pertencentes aos genótipos I descritos	105
D – Árvore filogenética baseada na sequência parcial com 666 nt (16-682 nt) da proteína VP1 de RV-A pertencentes aos genótipos R descritos	106

E – Árvore filogenética baseada na sequência parcial com 677 nt (44-720 nt) da proteína VP2 de RV-A pertencentes aos genótipos C descritos.....	107
F – Árvore filogenética baseada na sequência parcial com 568nt (70-637 nt) da proteína VP3 de RV-A pertencentes aos genótipos M descritos.....	108
G – Árvore filogenética baseada na sequência completa com 337 nt (238-574 nt) da proteína NSP1 de RV-A pertencentes aos genótipos A descritos	109
H – Árvore filogenética baseada na sequência completa com 936 nt (59-994 nt) da proteína NSP2 de RV-A pertencentes aos genótipos N descritos	110
I – Árvore filogenética baseada na sequência completa com 568 nt (444-1011 nt) da proteína NSP3 de RV-A pertencentes aos genótipos T descritos.....	111
J – Árvore filogenética baseada na sequência completa com 474 nt (95-568 nt) da proteína NSP4 de RV-A pertencentes aos genótipos E descritos.....	112
K – Árvore filogenética baseada na sequência completa com 669 nt (22-690 nt) da proteína NSP5/6 de RV-A pertencentes aos genótipos H descritos	113
L – Árvore filogenética com 894pb (63-957nt) da proteína VP7 genótipo G6 linhagem IV com as cepas de BoRV-A brasileiras	114
M – Árvore filogenética baseada em sequências com 542 nt (150-691 nt) da proteína VP4 das cepas de BoRV-A brasileiras pertencentes aos protótipos do genótipo P[5], utilizando o método de neighbor-joining e o modelo de Kimura two-parameter	115
N – Matriz de identidade de nucleotídeo 942pb (60-1001nt) entre linhagens e sublinhagens do BoRV-A genótipo G6.....	116
O – Porcentagem da distância de nucleotídeos 926 pb (60-985 nt) entre linhagens e sublinhagens do BoRV-A genótipo G6.....	117

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 INTRODUÇÃO

A criação de gado bovino no Brasil é uma atividade econômica que ocupa grande extensão de terras e implica diretamente na produção de carne e de leite (SCHLESINGER, 2010). O Brasil tem o maior rebanho comercial de bovinos do mundo, com aproximadamente 200 milhões de cabeças (MAPA, 2011) e os animais são criados a pasto, ou pelos sistemas de produção intensivo e semi-intensivo (ABIEC, 2011).

Em 2005, o Brasil se tornou o maior produtor e exportador de carne bovina, comercializando para mais de 170 países e em 2008, as exportações brasileiras de carne bovina representaram 28% do comércio internacional (ABIEC, 2010; ABIEC, 2011). A cadeia produtiva da bovinocultura de corte movimentava anualmente mais de R\$ 50 bilhões e é responsável pela geração de cerca de 7,5 milhões de empregos diretos e indiretos (EMBRAPA, 2010; IEPEC, 2010).

Quanto à produção leiteira, o Brasil está entre os seis maiores produtores mundiais (EMBRAPA, 2010; IEPEC, 2010) e entre os anos de 2006 e 2008 o país ingressou no mercado internacional com a exportação de produtos lácteos (SCHLESINGER, 2010).

Segundo Alfieri (2007), esse crescimento da produção bovina de corte e leite somente foi possível com o aprimoramento em técnicas de criação, manejo zootécnico e sanitário, nutrição e melhoramento genético. No entanto, com a intensificação da produção houve aumento na ocorrência de doenças infecto-parasitárias e contagiosas já existentes e o surgimento de novas enfermidades que acometem os bovinos, além de aumentar a ocorrência de infecções heterólogas e zoonoses. As doenças mais comuns em bovinos são as que ocasionam as desordens reprodutivas, respiratórias e entéricas e dentre as entéricas, as diarreias neonatais são as que determinam os maiores prejuízos econômicos à bovinocultura brasileira (ALFIERI et al., 2007).

1.2 DIARREIAS NEONATAIS

As diarreias neonatais são de origem multifatorial e multietiológica, envolvendo falhas nos manejos zootécnico e sanitário (más condições higiênicas, privação do colostro aos bezerros e fatores individuais de susceptibilidade), além de uma série de micro-organismos como bactérias, protozoários e vírus (BENDALI et al., 1999; ALFIERI et al.,

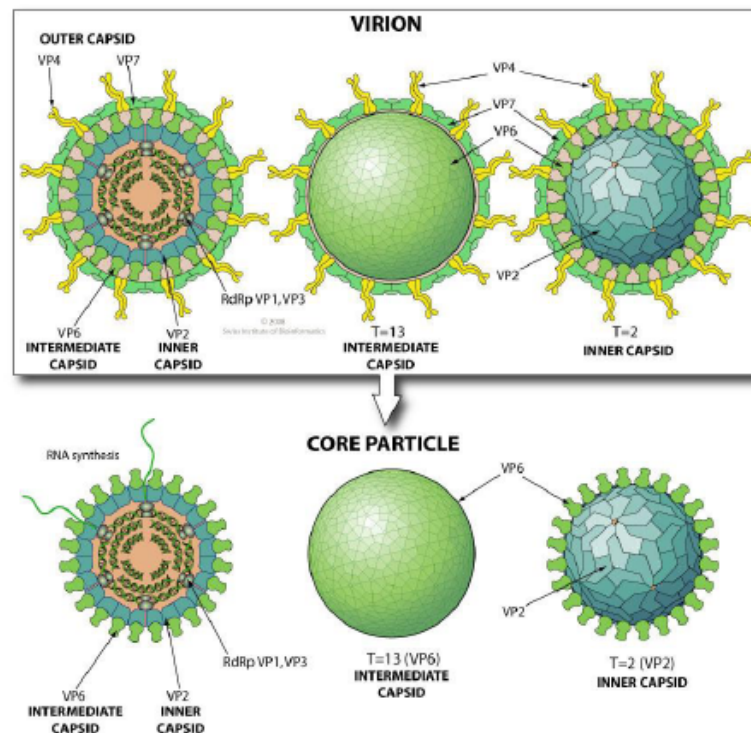
2007). Como consequência da diarreia neonatal, tem-se maior mortalidade e morbidade, aumento nos custos com o tratamento dos animais, perda de peso e aumento da susceptibilidade a outras infecções, principalmente doenças respiratórias (JANKE, 1989; PAUL; LYOO, 1993). Entre os agentes infecciosos mais frequentes causadores de diarreias neonatais na espécie bovina destacam-se bactérias (*Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* tipo C), protozoários (*Cryptosporidium*) e vírus (rotavírus e coronavírus) (BENDALI et al., 1999; ALFIERI et al., 2007).

1.3 ROTAVÍRUS

A rotavirose representa um problema de saúde pública mundial, pois o rotavírus (RV) é um dos agentes causadores mais comuns de gastroenterite aguda em crianças. Em animais, os RV também determinam diarreia em mamíferos domésticos, silvestres e aves (ALFIERI et al., 2007; ABE et al., 2009). Excepcionalmente, o RV pode alcançar o sistema circulatório e causar infecção com sinais de disfunção clínica do sistema nervoso de crianças e de animais imunossuprimidos (BLUTT et al., 2003).

O RV pertence ao gênero *Rotavirus* da família *Reoviridae*. O vírion, desprovido de envelope glicoprotéico, apresenta simetria icosaédrica com aproximadamente 70-90 nm de diâmetro e o capsídeo é composto por três camadas protéicas concêntricas (Fig.1). O genoma é constituído por 11 segmentos de RNA fita dupla segmentado (dsRNA), que codificam seis proteínas estruturais (VP1-VP4, VP6-VP7) e seis proteínas não-estruturais (NSP1-NSP6) que são encontradas em partículas virais maduras. Cada segmento genômico codifica apenas uma proteína, com exceção do segmento 11 que codifica duas proteínas (Fig.2) (ALFIERI et al., 2007; ESTES; KAPIKIAN, 2007).

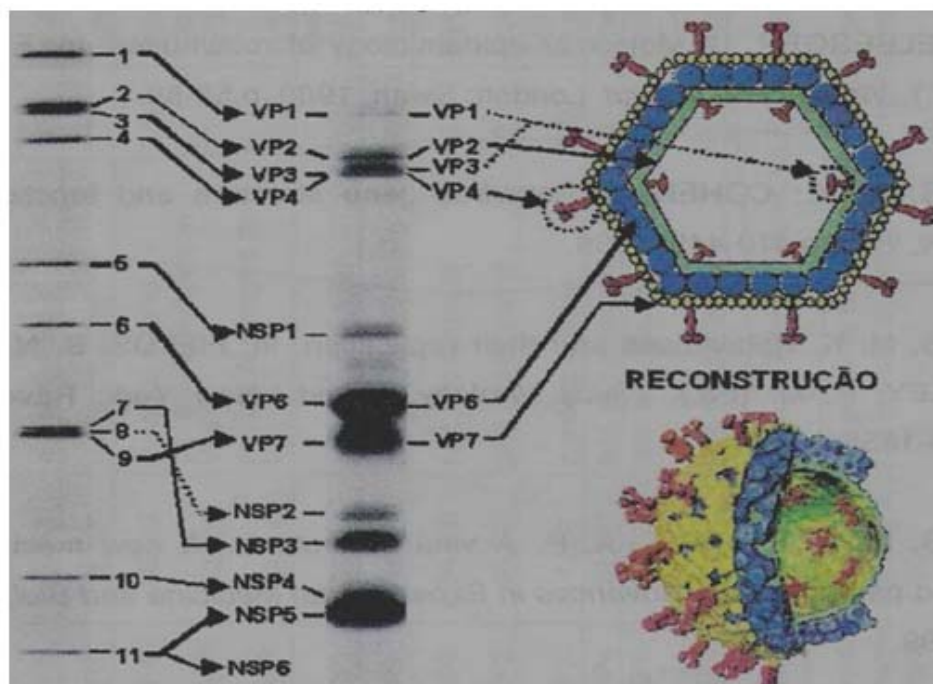
Fig.1 – Rotavírus com três camadas proteicas concêntricas que constituem o triplo capsídeo viral (camada externa, intermediária e interna), evidenciando a localização das proteínas estruturais.



Fonte: education.expasy.org/images.

Acessado em: 28.03.2011.

Fig.2 – Eletroforese em gel de poliacrilamida do genoma do rotavírus, RNA fita dupla, segmentado e as proteínas codificadas por cada segmento genômico. Partícula de rotavírus representada esquematicamente



Fonte: Estes (2001) (adaptado).

O capsídeo interno (*core* ou núcleo) é constituído pelas proteínas VP2, a mais abundante do núcleo, VP1 e VP3, que estão associadas diretamente ao genoma viral. As proteínas estruturais VP4 e VP7 formam a camada externa do capsídeo. A proteína VP6 encontra-se na camada intermediária do capsídeo (ESTES; KAPIKIAN, 2007). As proteínas NSPs são sintetizadas em células infectadas e apresentam funções em etapas do ciclo replicativo ou interação com proteínas do hospedeiro, que influenciam a patogênese ou a resposta imune na infecção (GREENBERG; ESTES, 2009).

A proteína NSP1 tem 58 kilodaltons (kDa), é composta por 491 aminoácidos (aa) e é codificada pelo segmento 5 do RNA. Possui atividade de ligação com o RNA, se associa ao citoesqueleto, interage com o fator 3 regulatório de interferon e está relacionada ao encapsidamento do RNA viral (ESTES; COHEN, 1989; PATTON, 1995; ESTES; KAPIKIAN, 2007).

A NSP2 (34 kDa) possui 317 aa e é codificada pelos segmentos 7, 8 ou 9, dependendo da amostra viral. Esta proteína não estrutural liga-se aos 11 segmentos de ω sRNA, acumula-se nos viroplasmas, possui atividade de replicase viral e NTPase (ESTES; COHEN, 1989; PATTON, 1995; ESTES; KAPIKIAN, 2007).

A NSP3 (34 kDa) possui 315 aa e também pode ser codificada pelos segmentos 7, 8 ou 9. Atua na tradução do wRNA formando uma ligação entre este e a maquinaria de tradução da célula hospedeira (ESTES; COHEN, 1989; PATTON, 1995; ESTES; KAPIKIAN, 2007).

A NSP4 (20 kDa) possui 175 aa e é codificada pelo segmento 10 do genoma viral. É uma enterotoxina com imunogenicidade específica capaz de mobilizar íons cálcio do retículo endoplasmático para o citoplasma, alterar a homeostase intracelular e induzir a apoptose celular. Além disso, a NSP4 age como receptor interno para as partículas virais (ESTES; COHEN, 1989; PATTON, 1995; ESTES; KAPIKIAN, 2007).

A NSP5 (21 kDa) é codificada pelo segmento genômico 11, possui 198 aa e ativa fosfoquinasas celulares e interage com a VP2, NSP2 e NSP6. Finalmente, a última proteína não-estrutural, NSP6 (11Kd), é um produto da ORF2 do segmento genômico 11 que é encontrada na célula infectada sob a forma de inclusões citoplasmáticas, formando complexos com a NSP5 e apresenta envolvimento no processo replicativo viral (ESTES; COHEN, 1989; PATTON, 1995; ESTES; KAPIKIAN, 2007).

A proteína VP1 (125 kDa) possui 1.088 aa, é sintetizada pelo segmento genômico 1 do RNA e possui atividade de RNA-polimerase (ESTES; COHEN, 1989; ESTES; KAPIKIAN, 2007).

A VP2 (102 kDa) é constituída por 880 aa e é codificada pelo segmento genômico 2. É altamente imunogênica e está envolvida no processo de organização e replicação do genoma viral, além de estar unida ao RNA e possuir função de formação do nucleocapsídeo (ESTES; COHEN, 1989; ESTES; KAPIKIAN, 2007).

A proteína VP3 (98 kDa) é codificada pelo segmento genômico 3, sendo constituída por 835 aa. Apresenta atividade de guanililtransferase, adicionando resíduos à estrutura 5' *-cap* dos RNAs mensageiros (ESTES; COHEN, 1989; ESTES; KAPIKIAN, 2007).

A proteína VP4 (86 kDa), constituída por 766 aa, é codificada pelo segmento 4 do genoma viral. A VP4 é a responsável pela indução de anticorpos neutralizantes e ligação dos RV aos enterócitos. Além disso, a proteína VP4 possui um sítio de clivagem pela tripsina e gera duas proteínas, VP5* e VP8*, que são responsáveis por aumentar a infectividade viral (ESTES; COHEN, 1989; ESTES; KAPIKIAN, 2007).

A proteína VP7 (37 kDa) é uma glicoproteína formada por 326 aa. É codificada pelos segmentos 7, 8 ou 9 do λ sRNA, dependendo da amostra viral. É considerada uma proteína altamente imunogênica que induz a formação de anticorpos neutralizantes. A proteína VP7 está envolvida no processo de penetração do vírus na célula (ESTES; COHEN, 1989; ESTES; KAPIKIAN, 2007).

A proteína VP6 (44 kDa) possui 397 aa e é codificada pelo segmento genômico 6. Representa cerca de 50% a 60% da massa viral. É segregada independentemente das proteínas VP7 e VP4. É altamente antigênica e imunogênica, comportando ainda os antígenos de grupo e subgrupo dos RV. A VP6 determina a classificação dos RV em sete sorogrupos (A-G). Os sorogrupos A, B e C podem infectar animais e seres humanos e os sorogrupos D-G causam infecção apenas nos animais (ESTES; COHEN, 1989; ALFIERI et al., 2006; ESTES; KAPIKIAN, 2007; ABE et al., 2009).

As proteínas codificadas por cada gene do RV-A, o tamanho molecular, localização no vírion e funções para a replicação do RV-A estão demonstrados no quadro 1.

Quadro 1 – Funções atribuídas às proteínas codificadas pelos segmentos genômicos do rotavírus.

Gene ⁽¹⁾	Tamanho (pb)	Proteína	Massa Molec. (Da)	Localização	Funções
1	3.302	VP1	125.005	Nucleocapsídeo	RNA polimerase dependente de RNA
2	2.690	VP2	102.431	Nucleocapsídeo	União ao RNA/Formação do nucleocapsídeo
3	2.591	VP3	98.120	Nucleocapsídeo	Guanililtransferase/Metiltransferase/Proteína Básica
4	2.362	VP4	86.782	capsídeo externo	Proteína de união à célula/Interage com VP6
		VP5 ⁽²⁾	60.000	produto da clivagem de VP4	Infectividade viral aumenta após clivagem pela tripsina formando VP5 e VP8
		VP8 ⁽²⁾	28.000	produto da clivagem de VP4	VP5 permeabiliza membranas
5	1.611	NSP1	58.654	prot. não estrutural	Associa-se com citoesqueleto/Interage com fator 3 regulatório de IFN
6	1.356	VP6	48.16	Capsídeo intermediário	Proteína estrutural do capsídeo intermediário/Antígeno de subgrupo
7	1.105	NSP3	34.600	prot. não estrutural	Envolvida na regulação da tradução
8	1.059	NSP2	36.700	prot. não estrutural	Acumula-se em viroplasmos/Atividade NTPase/Liga NSP5 e VP1
9	1.062	VP7	7.368	capsídeo externo	Glicoproteína estrutural do capsídeo externo/Antígenos neutralizantes G-tipo
10	751	NSP4	20.290	prot. não estrutural	Enterotoxina/Receptor para partícula com duplo capsídeo no RE
11	667	NSP5	21.725	prot. não estrutural	Possível cinase autocatalítica/Interage com VP2, NSP2 e NSP6
		NSP6	11.012	prot. não estrutural	Produto de ORF2 do gene 11/Interage com NSP5/Localizada em viroplasmos

Fonte: Estes (2001) (adaptado) e Matthijnssens et al. (2008a) (com modificações).

1.4 ROTAVÍRUS BOVINO SOROGRUPO A (RV-A)

O RV-A é o sorogrupo mais frequentemente detectado e o de maior importância, pois já foi verificada a associação entre a presença do vírus e o quadro clínico de diarreia (ALFIERI et al., 2006; ESTES; KAPIKIAN, 2007; ABE et al., 2009; BUZINARO et al., 2009). A ampla disseminação dos RV é facilitada por sua excreção prolongada e em altos títulos (cerca de 10^{10} a 10^{11} partículas virais por grama de fezes) (ESTES, 2001); pela existência de animais assintomáticos; e pela grande resistência do vírus no meio ambiente (ALFIERI et al., 2007), o que facilita a contaminação ambiental e a transmissão do agente etiológico (ESTES, 2001).

Os RV sorogrupos B e C causam diarreia principalmente em bovinos adultos (PARWANI et al., 1996) enquanto o sorogrupo A causa diarreia principalmente em bezerros jovens, tendo sido relatados alguns casos em animais adultos (SATO et al., 1997) e mais raramente em infecções assintomáticas (FUKAI et al., 2007; ABE et al., 2009). As infecções assintomáticas ou subclínicas podem afetar a biologia e a evolução dos RV, podendo ser encontrados novos genótipos ou genótipos menos relatados (FUKAI et al., 2007; ABE et al., 2009) servindo de fonte de contaminação para outros bezerros e animais suscetíveis (FIJTMAN et al., 1987; LUCHELLI et al., 1992).

Na bovinocultura, a rotavirose apresenta grande importância epidemiológica e sanitária por ocasionar alta morbidade e mortalidade, causar alteração na taxa de conversão

alimentar, no ganho de peso e por aumentar os custos de produção (GARAICOECHEA et al., 2006; ALFIERI et al., 2007).

Nos bovinos, o RV é um dos principais agentes do "Complexo Diarreia Neonatal Bovina" e acomete, principalmente, animais com até quatro semanas de idade, tanto em criações extensivas quanto intensivas. A idade mais frequente de animais acometidos é entre 16 e 30 dias de idade, diminuindo consideravelmente em animais entre 31 e 45 dias. A maior susceptibilidade dos animais jovens é ocasionada pela deficiência de imunidade passiva dos recém-nascidos, dependente da passagem de imunoglobulinas IgA presentes no colostro (ALFIERI et al., 2006; BUZINARO et al., 2009).

Os enterócitos apicais das vilosidades do intestino delgado do hospedeiro possuem função digestiva e absorptiva, e a replicação do rotavírus ocorre nestas células, acarretando em lise e descamação intestinal. Os enterócitos são substituídos por células cuboides imaturas, provenientes da cripta intestinal que apresentam pouca capacidade de absorção e digestão da lactose presente no leite, culminando em diarreia por má absorção e do curso branco, devido à presença de leite não digerido nas fezes (LUNDGREN; SVENSSON, 2001).

Os bezerros recém-nascidos apresentam reposição de enterócitos mais lenta que os animais mais velhos, nos quais existe uma competição entre a taxa de reposição celular e a replicação vírica, e apenas as cepas virais muito virulentas são capazes de causar diarreia nos animais adultos. No caso dos animais mais jovens, o vírus é capaz de fazer um ciclo completo de replicação e produzir nova progênie que infectam outras células. Isto favorece a duração da infecção e a lesão nas vilosidades intestinais, causando a diarreia (VARSHNEY et al., 1995).

Na bovinocultura de corte e leite, o manejo reprodutivo em estação de monta de 90 a 120 dias resulta em concentração dos nascimentos, o que facilita a transmissão viral entre os bezerros. Isto não ocorre com tanta frequência na bovinocultura de leite, uma vez que os nascimentos são distribuídos durante o ano (ALFIERI et al., 2006). A presença de baixos títulos de vírus circulantes durante o ano todo provenientes de bezerros de gado leiteiro e a constante presença de hospedeiros susceptíveis, facilita a ocorrência da diversidade antigênica e molecular do RV (GARAICOECHEA et al., 2006).

1.5 SOROTIPOS P (VP4) E G (VP7) DE RV-A

As proteínas estruturais VP4 e VP7 são responsáveis pelas interações iniciais do vírus com a célula hospedeira, pela indução de anticorpos neutralizantes e determinação da classificação viral em sorotipos e genotipos (ESTES, 1996; HOSHINO et al., 2002).

Por meio do uso de anticorpos monoclonais são reconhecidos 14 sorotipos P diferentes (1A, 1B e 2 a 14). A proteína VP7 é uma glicoproteína e são definidos 14 sorotipos G distintos (MATTHIJNSSENS et al., 2008a). No entanto, devido a não disponibilidade de anticorpos monoclonais para diferenciar eficientemente os rotavírus sorotipos P, a genotipagem pela técnica da RT-PCR é utilizada como alternativa à sorotipagem. Os genotipos e sorotipos G apresentam a mesma classificação e os genotipos e sorotipos P são numerados independentemente. Para demonstrar o genotipo P coloca-se colchetes (ESTES, 1996; HOSHINO et al., 2002).

1.6 GENOTIPOS P (VP4) E G (VP7) DE RV-A

De acordo com o segmento genômico que codifica as proteínas VP4 e VP7 dos RV são relatados 35 diferentes genotipos P (VP4) e 27 genotipos G (VP7) (MATTHIJNSSENS et al., 2011). Como o genoma viral é segmentado, pode ocorrer o ressortimento, que é a troca entre os segmentos genômicos de cepas virais distintas quando infectam a mesma célula e o surgimento de diferentes genotipos (PALOMBO, 2002; MARTELLA et al., 2003; ALFIERI et al., 2007; ABE et al., 2009).

Os genes VP4 e VP7 pertencerão ao mesmo genotipo P e G, respectivamente, se apresentarem identidade genética igual ou superior a 89% em aminoácido (aa) e 80% em nucleotídeo (nt) (GREEN et al., 1988; GORZIGLIA et al., 1990; ESTES, 2001; MATTHIJNSSENS et al., 2008a).

Algumas combinações das proteínas VP4 e VP7 tendem a aparecer mais frequentemente na natureza (GORZIGLIA et al., 1988). Os genotipos de RV mais comumente encontrados em amostras fecais de bezerros com diarreia são G6, G8, G10, P[1], P[5] e P[11]. As combinações mais frequentes são: G6P[1] (NCDV - Lincoln), G6P[5] (UK); G10P[11] (B223), G8P[1] (A5) (SNODGRASS et al., 1990; ISHIZAKI et al., 1996; FUKAI et al., 1999; FUKAI et al., 2002; OKADA; MASTUMOTO, 2002; ALFIERI et al., 2004; BARREIROS et

al., 2004; GARAIKOECHEA et al., 2006; REIDY et al., 2006; BUZINARO et al., 2009; SWIATEK et al., 2009; MIDGLEY et al., 2012).

O genótipo G6P[5] já foi relatado como o mais frequente em bezerros com sinal clínico de diarreia no Japão (SUZUKI et al., 1993; ISHIZAKI et al., 1996, OKADA; MATSUMOTO, 2002). Reidy et al. (2006), identificaram o genótipo G6P[5] como o mais frequente (57,4%), em amostras fecais de bezerros com diarreia no período de 2002 a 2004 na Irlanda. Swiatek et al. (2009), também caracterizaram o genótipo G6P[5] como o mais prevalente (38,5%) em bezerros com e sem diarreia em rebanhos bovinos leiteiros e de corte da Austrália no período de 2004 a 2005. Garaicoechea et al. (2006), na Argentina verificou 60% do genótipo G6P[5] em bezerros com diarreia em gado de corte. Midgley et al. (2012), em um estudo recente realizado em rebanhos bovinos na Europa (Dinamarca, França, Hungria, Itália e Eslovênia) identificaram os genótipos G6P[5] como um dos mais frequentes em bezerros.

No Brasil, o genótipo G6P[5] também tem sido relatado como o mais prevalente em rebanhos bovinos de leite em São Paulo (FREITAS et al., 2011); em rebanhos de corte de São Paulo (BUZINARO et al., 2009) e em rebanhos de leite e corte dos estados de Mato Grosso do Sul, São Paulo, Goiás e Paraná (ALFIERI et al., 2004). Em Goiás, foi verificada infecção mista em rebanhos de leite entre os genótipos G6P[11], G6P[1], G10P[11] (CARUZO et al., 2010) e G6P[5] e G10P[11] (BRITO et al., 2000).

1.7 GENÓTIPO G6

O genótipo G6 de RV é encontrado nas espécies bovina, caprina, suína e humana. Como o genótipo G6 é comumente encontrado em bovinos, existe grande possibilidade de que os genótipos G6 de origem humana sejam derivados de rotavírus bovino grupo A (BoRV-A) por transmissão interespecífica (bovino e humano). O ressortimento possivelmente ocorreu entre a cepa viral PA151 (de origem humana) e MC27 (de origem bovina), sendo capaz de infectar seres humanos (COONEY et al., 2001; PALOMBO, 2002).

Os genótipos G6 de RV de origem humana que tem aparecido em ressortimento com RV de humanos ou de bovinos estão distribuídos mundialmente, apesar da baixa prevalência (YAMAMOTO et al., 2011). O genótipo G6 já foi identificado em crianças com diarreia em países como Egito (SHERIF et al., 2011), Japão (YAMAMOTO, et al., 2011), Itália (DE GRAZIA et al., 2011), Nova Zelândia (CHANDRAHASSEN et al., 2010),

França (ROUGEMONT et al., 2009), Brasil (MUNFORD et al., 2007), Holanda (BANYAI et al., 2003) e Austrália (COONEY et al., 2001).

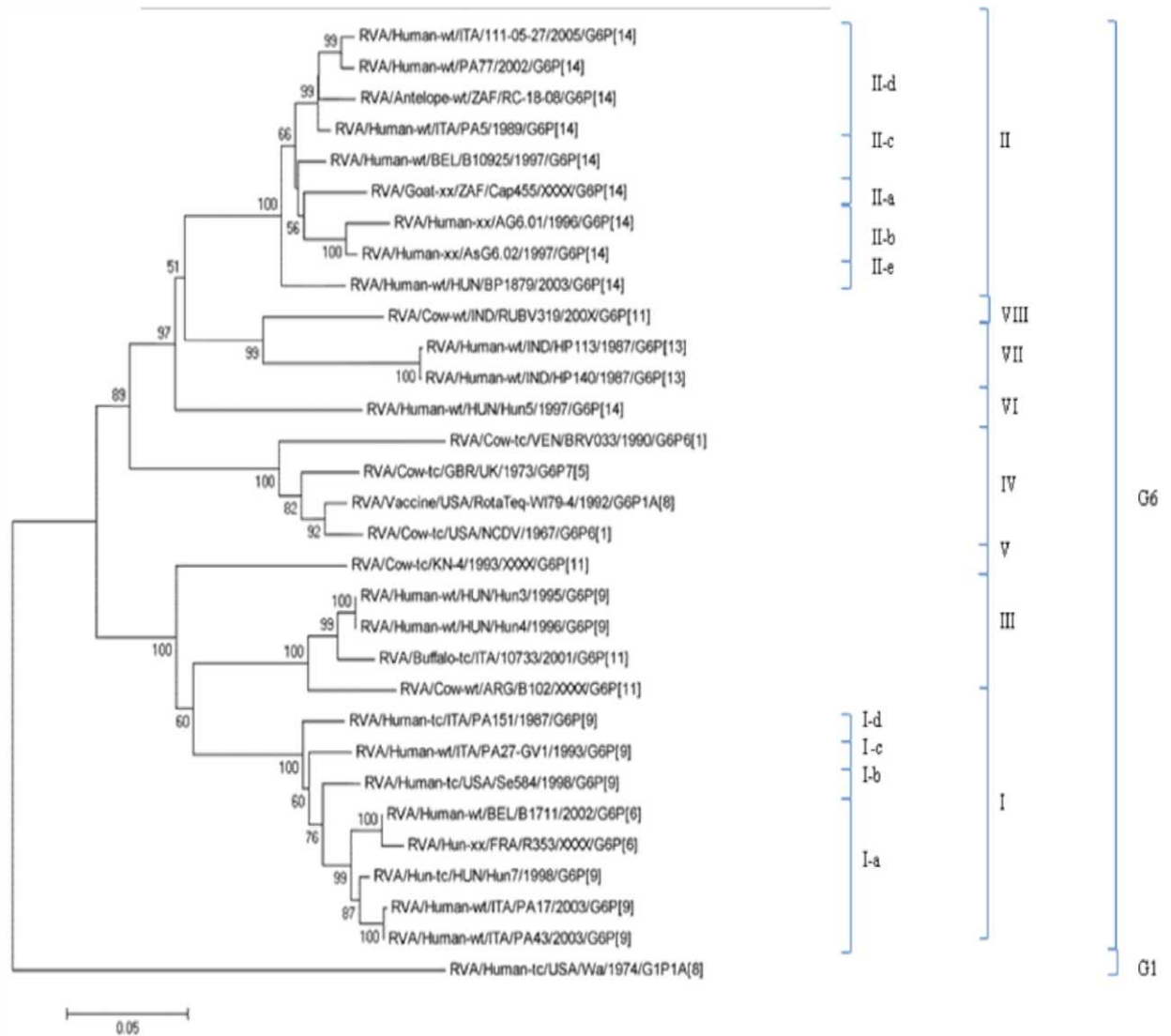
Sugere-se que as rotavíruses por genótipos G6 podem ocorrer independentemente em diferentes países por meio do ressortimento natural entre cepas locais, uma vez que poucos segmentos dos genes entre os RV G6 de origem humana são diferentes (MUNFORD et al., 2007, YAMAMOTO et al., 2011).

Para pertencer ao genótipo G6, a proteína VP7 deve apresentar 90 a 100% de identidade nas regiões de posição entre os aa, denominadas A a F (MUMMIDI et al., 1996). A distribuição dos aa em cada região segue o seguinte padrão: região A (87 a 101 aa), B (143 a 152 aa), C (208 a 221 aa) (DYALL-SMITH et al., 1986; HARDY et al., 1991), D (65 a 76 aa), E (189 a 190 aa) e F (235 a 242 aa) (NISHIKAWA et al., 1989; KIRKWOOD et al., 1993). Estas regiões são consideradas hipervariáveis e são as regiões antigênicas que diferenciam as cepas virais.

1.8 LINHAGENS DO GENÓTIPO G6 (VP7)

São consideradas oito linhagens no genótipo G6 de RV (Fig.3). A linhagem G6-I e G6-II foram recentemente divididas em quatro sublinhagens (I-a - I-d) e cinco (II-a -II-e) sublinhagens, respectivamente (Quadro 2) (DE GRAZIA et al., 2011).

Fig.3 –Árvore filogenética baseada em sequências com 950 nt (58-1007 nt) da proteína VP7 do RV-A pertencentes aos protótipos das linhagens do genótipo G6, utilizando o método de *neighbor-joining* e o modelo de *Kimura two-parameter*. As sequências VP7 do RV-A (e seus números de acesso no *GenBank*) são as seguintes: PA17/03 (JF793943), PA43/03 (JF793944), Hun7 (AJ488134), B1711 (AF532202), R353 (DQ122400), Se584/98 (EF672609), PA27-GV1/93 (JF793942), PA151/97 (L20881), BP1879/03 (FN665685), RC-18-08 (FJ495133), PA5/89 (JF793945), 111-05-27/05 (EF554142), PA77/02 (JF793946), B10925/97 (EF554120), Cap455 (AY128708), AG6.01/96 (AF207063), ASG6.02 (AF421183), B102 (DQ631815), 10733/01 (AY281360), Hun3/95 (AJ487831), Hun4/96 (AJ487833), RotaTeq-WI79-4/92 (GU565046), NCDV (M12394), UK (X00896), BRV033/90 (U62154), KN-4/93 (D12710), Hun5/97 (EF554109), HP113/87 (DQ003292), HP140/87 (DQ003293), RUBV319 (EF199501), IND (U15000), RF (X65940), Wa (K02033) *outgroup*. Os números adjacentes à árvore representam a porcentagem de *bootstrap* (1000 replicações). Valores de *bootstrap* abaixo de 50% foram omitidos.



Fonte: Adaptado de Grazia et al. (2011).

Quadro 2 – Cepas de rotavirus grupo A de origem humana e animal das linhagens e sublinhagens do genotipo G6 (VP7).

Linhagens G6	Sublinhagens G6	Cepas
I	A	Humana
	B	Humana
	C	Humana
	D	Humana
II	A	Caprina
	B	Humana
	C	Humana
	D	Humana, Antilope
	E	Humana
III	-	Bovina, Búfalo, Humana
IV	-	Bovina
V	-	Bovina
VI	-	Humana
VII	-	Humana
VIII	-	Bovina

Fonte: De Grazia et al. (2011) (adaptado)

Existe divergência homotípica significativa entre os RV G6 de origem humana e bovina, sugerindo a existência de antigenicidade distinta entre as linhagens G6, assim como a espécie de origem e o genotipo P associado (CHANG et al., 2000; COONEY et al., 2001).

A análise filogenética dos genotipos G6 de amostras virais provenientes de humanos e de bovinos demonstra que geralmente os vírus se agrupam na árvore filogenética de acordo com a espécie animal (COONEY et al., 2001).

Variações na proteína VP7 dos genotipos G6, G8 e G10 podem ocorrer por transmissão interespecies e/ou ressortimento com diferentes genotipos (especialmente VP4), seguido por seleção natural ou por pressão imune durante a infecção, podendo ocorrer constante evolução da proteína VP7 circulante, mesmo em condições naturais (CHANG et al., 2000, MARTELLA et al., 2003).

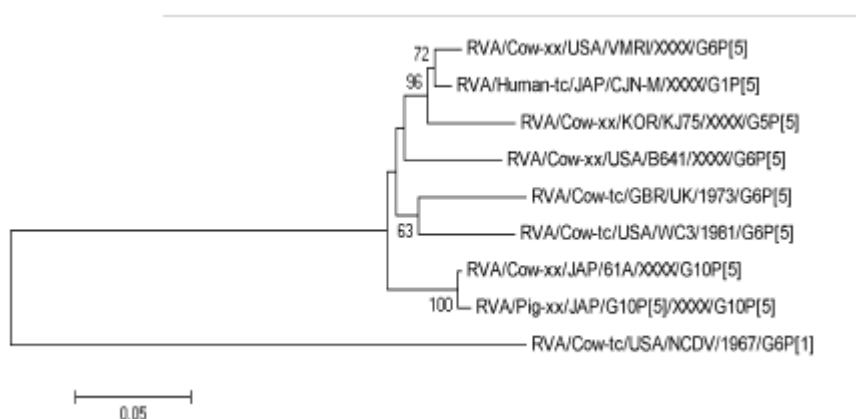
Segundo Woode et al. (1983), a imunidade cruzada ocorre entre o mesmo genotipo G6, mas quando ocorre diferença genotípica, mesmo que pequena, a proteção cruzada torna-se insuficiente. No entanto, Chang et al. (2000) relataram que a imunidade entre as diferentes linhagens G6 provém ao menos um pouco de proteção cruzada contra outra linhagem, mesmo quando o genotipo P é diferente.

1.9 GENOTIPO P[5]

Os epítomos antígenos neutralizantes que apresentam reatividade cruzada da proteína VP4 estão localizados na subunidade VP5* e os epítomos tipo específicos estão principalmente na VP8* (GORZIGLIA et al., 1990). Por esta razão, o fragmento entre os aa 71 e 204, que representa a região de clivagem da proteína VP8* e o local de domínio de maior variabilidade é a mais comparada entre as diferentes cepas virais e correlaciona a especificidade genotípica da proteína VP4 (LARRALDE; GORZIGLIA, 1992; LARRALDE et al., 1991). Larralde; Gorziglia (1992) demonstraram que as regiões entre os aa 84 e 180 (peptídeo B), estão envolvidas na especificidade sorotípica, e as regiões A (1 - 102 aa) e C (150 - 251 aa) mostraram reatividade sorotípica cruzada.

Até o presente momento o genotipo P[5] não é classificado em linhagens (Fig.4) (SWITEK et al., 2009).

Fig.4 –Árvore filogenética baseada em sequências com 877 nt (11-887 nt) da proteína VP4 do RV-A pertencentes aos protótipos do genotipo P[5], utilizando o método de *neighbor-joining* e o modelo de *Kimura two-parameter*. As sequências VP7 do RV-A (e seus números de acesso no *GenBank*) são as seguintes: UK (M22306), WC3 (AY050271), VMRI (U53923), CJN-M (D16351), B641 (M63267), G10P5 (U35851), KJ75 (DQ494408), NCDV (AB119636), 61A(D13396). Os números adjacentes à árvore representam a porcentagem de *bootstrap* (1000 replicações). Valores de *bootstrap* abaixo de 50% foram omitidos.



Fonte: Adaptado de Swiatek et al. (2009).

1.10 NOVA CLASSIFICAÇÃO DO RV-A: GENOTIPOS I (VP6), R (VP1), C (VP2), M (VP3), A (NSP1), N (NSP2), T (NSP3), E (NSP4) E H (NSP5/6)

Devido à diversidade entre genótipos G e P, a dificuldade de identificar os sorótipos P por anticorpos monoclonais específicos e a ocorrência de ressortimento, foi proposta uma nova classificação com a utilização do genoma completo do RV com sequenciamento de todos os 11 segmentos genômicos (MATTHIJNSSENS et al., 2008a).

Nesta nova classificação foram nominados os genótipos Gx-P[x]-Ix-Rx-Cx-Mx-Ax-Nx-Tx-Ex-Hx para as proteínas VP7-VP4-VP6-VP1-VP2-VP3 -NSP1-NSP2-NSP3 -NSP4-NSP5, respectivamente (Quadro 3) (MATTHIJNSSENS et al., 2008a).

A combinação mais comum dos genótipos I, R, C, M, A, N, T, E e H encontrados em bovinos são I2, R2, C2, M2, A3 e A14, N2, T6 e T7, e E2, H3, respectivamente (DE GRAZIA et al., 2011;. MATTHIJNSSENS et al., 2011).

Quadro 3 – Funções atribuídas às proteínas codificadas pelos segmentos genômicos do rotavírus e a porcentagem de identidade de nucleotídeo (nt) para cada gene (valor de corte).

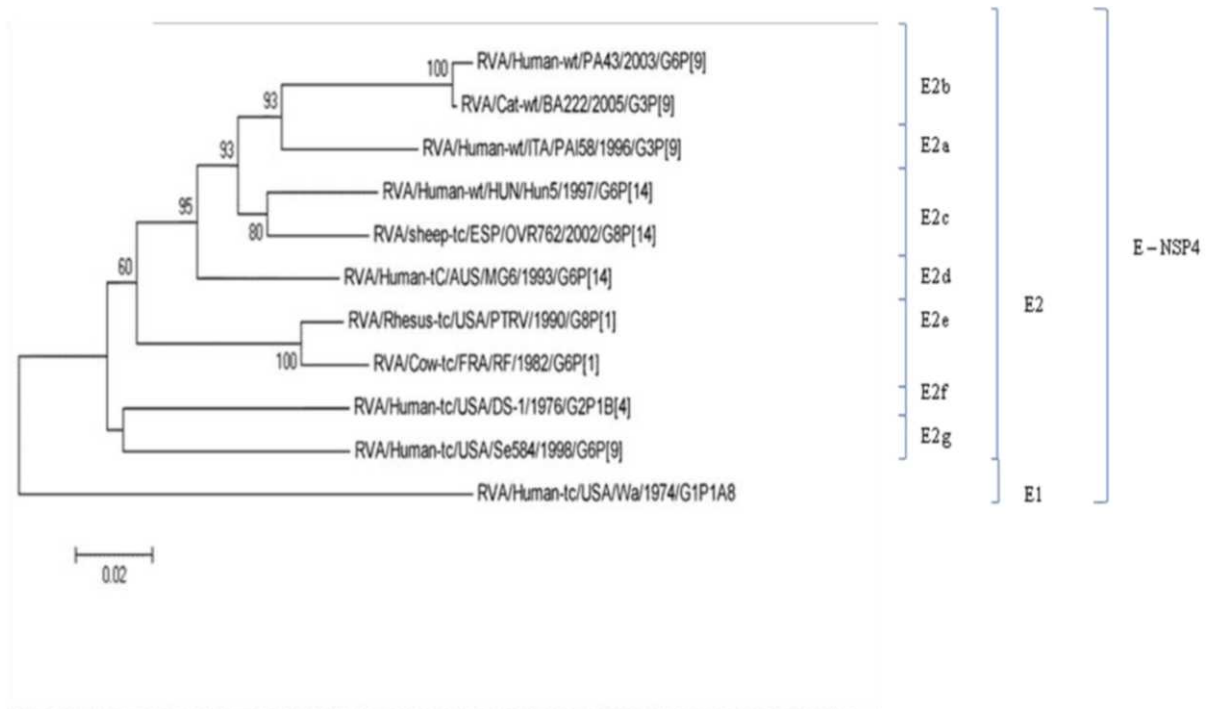
Proteína	Função	Genótipos (n)	Identidade em nt (% do valor de corte)
VP1	<i>RNA-dependent RNA polymerase</i>	R (9)	83
VP2	<i>Core protein</i>	C (9)	84
VP3	<i>Methyltransferase</i>	M (8)	81
VP4	<i>Protease Sensitive</i>	P (35)	80
VP6	<i>Inner capsid</i>	I (16)	85
VP7	<i>Glycosylated</i>	G (27)	80
NSP1	<i>Interferon Antagonist</i>	A (16)	79
NSP2	<i>NTPase</i>	N (9)	85
NSP3	<i>Translation enhancer</i>	T (12)	85
NSP4	<i>Enterotoxin</i>	E (14)	85
NSP5/6	<i>pHosphoprotein</i>	H (11)	91

Fonte: ESTES (2001) e MATTHIJNSSENS (2008) (com modificações).

1.11 LINHAGENS DO GENÓTIPO E2 (NSP4)

O genótipo E2 do RV-A (proteína NSP4) é dividido em sete (E2a-g) linhagens (Fig.5). As linhagens E2a, E2d, E2f e E2g contêm cepas de origem humana; E2e incluem cepas de origem bovina e E2b e E2c, contêm cepas de origem humana e animal (DE GRAZIA et al., 2011).

Fig.5 –Árvore filogenética baseada em seqüências com 650 nt (29-679 nt) da proteína NSP4 do RV-A pertencentes aos protótipos do genótipo E2, utilizando o método de *neighbor-joining* e o modelo de *Kimura two-parameter*. As seqüências NSP4 do RV-A (e seus números de acesso no *GenBank*) são as seguintes: Wa (K02032), PA158 (GU296417), PA43 (JF793928), B222 (GU827415), Hun5 (EF554113), OVR762 (EF554157), MG6 (EF554102), PTRV (FJ422140), RF (AY116593), DS-1 (HQ650125), Se584 (AJ311730). Os números adjacentes à árvore representam a porcentagem de *bootstrap* (1000 replicações). Valores de *bootstrap* abaixo de 50% foram omitidos.

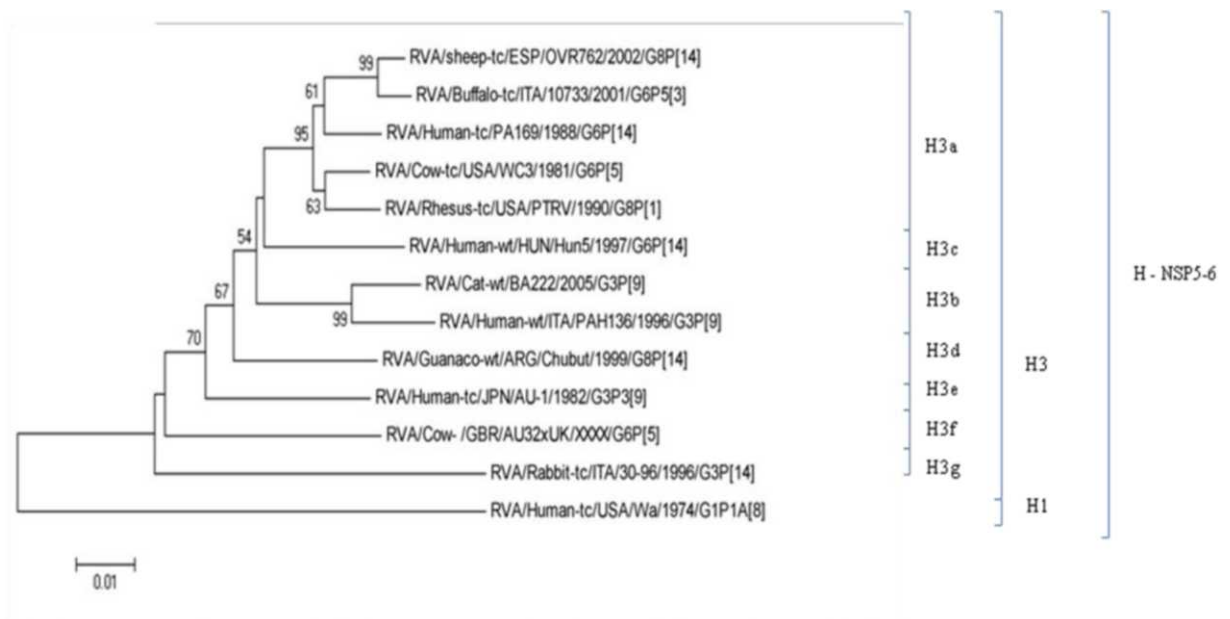


Fonte: Adaptado de De Grazia et al. (2011).

1.12 LINHAGENS DO GENÓTIPO H3 (NSP5/6)

O genótipo H3 (proteína NSP5/6) é dividido em sete (H3a-g) linhagens (Fig.6). As linhagens H3c e H3e incluem cepas de origem humana. A linhagem H3f contém cepas de origem bovina. As linhagens H3a, H3b, incluem cepas de origem humana e animal, e as linhagens H3d e H3g contêm apenas cepas de origem animal (DE GRAZIA et al., 2011).

Fig.6 –Árvore filogenética baseada em seqüências com 597 nt (20-618 nt) da proteína NSP5/6 do RV-A pertencentes aos protótipos do genótipo H3, utilizando o método de *neighbor-joining* e o modelo de *Kimura two-parameter*. As seqüências NSP5/6 do RV-A (e seus números de acesso no *GenBank*) são as seguintes: Wa (AF306494), AU-1 (AB008656), OVR762 (EF554158), 10733 (EU659853), PA169 (EF554136), PTRV (FJ422141), B222 (GU827416), PAH136 (GU296418), Hun5 (EF554114), Chubut (FJ347110), AU32xUK (GQ496296), 30-96 (DQ205231). Os números adjacentes à árvore representam a porcentagem de *bootstrap* (1000 replicações). Valores de *bootstrap* abaixo de 50% foram omitidos.



Fonte: Adaptado de De Grazia et al. (2011).

1.13 LINHAGENS DO GENÓTIPO I2 (VP6)

O genótipo I2 (proteína VP6) é dividido em cinco (I2a-e) linhagens (Fig.7). As linhagens I2d contém cepas de origem humana. As linhagens I2a, I2b, I2c e I2e incluem cepas de origem humana e animal. As linhagens I2b e I2c contém cepas de origem bovina (DE GRAZIA et al., 2011).

Fig.7 –Árvore filogenética baseada em sequências com 235 nt (873-1007 nt) da proteína VP6 do RV-A pertencentes aos protótipos do genótipo I2, utilizando o método de *neighbor-joining* e o modelo de *Kimura two-parameter*. As sequências VP6 do RV-A (e seus números de acesso no *GenBank*) são as seguintes: Wa (K02086), PA77 (JF793935), Aragon (FN675938), PA151 (JF793936), DijonA282 (GU259607), PTRV (FJ422136), WC3 (AF411322), PA169 (EF554130), MG6 (EF554097), Hun5 (EF554108). Os números adjacentes à árvore representam a porcentagem de *bootstrap* (1000 replicações). Valores de *bootstrap* abaixo de 50% foram omitidos.



Fonte: Adaptado de De Grazia et al. (2011).

1.14 POTENCIAL ZOONÓTICO DO ROTAVÍRUS

Os animais podem atuar como reservatórios do RV para a infecção de seres humanos. O ressortimento entre os segmentos genômicos favorece a evolução viral, além da possível adaptação a outros hospedeiros, inclusive o homem (PALOMBO, 2002; MARTELLA et al., 2010; ALFIERI et al., 2007; ABE et al., 2009).

Em vários países em desenvolvimento existe estreito contato entre humanos e animais domésticos. Em áreas propensas a inundações aumentam as chances de contato com fezes de animais. Em países desenvolvidos, o contato com fezes é menor do que em países em desenvolvimento, mas pode ser suficiente para a entrada de cepas ou genes de RV de origem animal na população humana. Além das fezes, efluentes e poeira também podem servir de veículo para a transmissão do RV, que pode contaminar água de consumo e alimentos, constituindo formas de transmissão indireta dos RV tanto para animais quanto para seres humanos (COOK et al., 2004).

Martella et al. (2003) identificaram RV-A em fezes diarreicas de búfalo e analisaram as proteínas VP7, VP4, VP6, NSP4 e NSP5/6. Neste estudo foi verificado ressortimento na proteína VP4, em que o genótipo P encontrado foi o P[3], proveniente de macaco *rhesus*, que era o genótipo utilizado em vacinas atenuadas para seres humanos. O genótipo G6, comumente encontrado em ruminantes, apresentou identidade de 88-98% em aminoácido com o genótipo G6 da cepa BRV033 de bovino descrita na Venezuela e a cepa Hun4 encontrada em humanos. No entanto, as proteínas NSP5/6, NSP4 e VP6 foram de genótipos provenientes de bovinos. Com isso, pode-se constatar a variação entre os genótipos, a ocorrência de ressortimento e possibilidade de transmissão interespecíficas.

Ciarlet et al. (2002), analisaram as proteínas VP4, VP6, VP7 e NSP4 da cepa WC3 proveniente de bovinos que é utilizada atualmente na vacina atenuada de seres humanos. Pode-se classificar a cepa em genótipo P[5] (VP4) com alta identidade em aminoácidos (93-96%) com a cepa UK (G6P[5]); o genótipo G6 (91-97%) (VP7) e a proteína VP6 (96-99%), altamente relacionadas com os protótipos UK e NCDV-Lincoln (G6P[1]); e a proteína NSP4 (96-99%) com maior identidade em aminoácidos com a cepa UK.

Park et al. (2006), analisaram as cepas KJ44 e KJ75, provenientes de bovinos com diarreia. A proteína VP4 da cepa KJ44 apresentou 91,7 a 96,3% de identidade em aminoácido com o genótipo P[1] e a cepa KJ75 apresentou identidade de 91,9 a 96,9% em aa com o genótipo P[5]. Com relação à proteína VP3, demonstrou maior identidade a um genótipo bovino. A proteína VP7 de ambas as cepas apresentou genótipo G5 com maior identidade em aminoácidos (90,4 a 99%) com uma cepa de origem suína. A proteína NSP4 também mostrou maior identidade com uma cepa proveniente de suínos.

Abe et al. (2011), analisaram as cepas isoladas de bovinos assintomáticos denominadas AzuK-1 (genótipo G21P[29]) e Dai-10 (genótipo G24P[33]), ambas identificadas no Japão em 2007. Foi realizada a caracterização do genoma completo destas cepas e verificou-se que a proteína NSP3 pertencia a um novo genótipo, T9. A análise dos outros segmentos demonstrou genótipos típicos de RV bovinos, com exceção das proteínas VP4, VP7, VP6 e NSP3. As proteínas VP6 e NSP2 das cepas AzuK-1 e Dai-10 migraram na árvore filogenética com RV de origem símia ou de caninos/felinos, ao invés de RV bovinos. Estes achados indicam a possibilidade de introdução por ressortimento de genótipos de símios, caninos e felinos em amostras de RV de origem bovina.

Ghosh et al. (2011), analisaram a cepa G8P[1] denominada B12, identificada a partir de uma criança assintomática, no Quênia em 1987. Este genótipo é relatado em bovinos, mas raramente em humanos. Por análise filogenética, as sequências de

nucleotídeos das proteínas VP7-VP4, VP6, VP1-VP2-VP3, NSP1-NSP2-NSP3 -NSP4-NSP5/6 da cepa foram distribuídas nos genótipos G8-P[1]-I2-R2-C2-M2-A3-N2-T6-E2-H3, respectivamente. Cada um dos 11 genes da cepa B12 pareceu estar mais relacionado aos genes provenientes de artiodáctilos (ruminantes e/ou camelos), mostrando pouca identidade a cepas de origem humana.

Um estudo relatou a primeira sequência completa do genoma de uma cepa de RV identificada em caprinos denominada GO34 proveniente de Bangladesh. As proteínas VP7-VP4, VP6, VP1-VP2-VP3, NSP 1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5 da cepa, foram designados para os genótipos G6-P[1]-I2-R2-C2-M2-A11-N2-T6-E2-H3, respectivamente. A cepa GO34 estava relacionada com as proteínas VP4, VP6-7 e NSP4-5 de cepas provenientes de bovinos e a proteína NSP1 de ovinos. As proteínas VP2-3 tiveram menos de 90% de identidade em aa com outras cepas de caprinos e a NSP3 foi associada a genes de cepas provenientes de humanos, ruminantes e camelídeos. As proteínas VP1, VP6 e NSP2 da cepa de caprinos GO34 exibiu parentesco genético com os genótipos de humanos G2, G6, G8 e G12, enquanto a NSP1 também foi estreitamente ligada a cepa de humanos G6P[14] (GHOSH et al., 2010).

Matthijnsens et al. (2008b) estudaram o genoma completo de duas cepas de RV de origem humana. A Wa-Like de origem humana apresentou maior semelhança com cepas de origem suínas e a cepa DS-1-Like de origem humana apresentou maior semelhança com cepas de origem bovina. Park et al. (2011) analisaram o genoma completo de duas cepas de bovinos contendo genes de origem bovina, suína e humana na Coreia do Sul.

1.15 VACINAS E FALHAS VACINAIS

O bom manejo do rebanho e a imunização são fatores essenciais para o controle de infecções por RV e redução das perdas econômicas (CARUZO et al., 2010). No entanto, devido à diversidade da associação entre os diferentes genótipos P e G de várias cepas virais, o mecanismo de evasão antigênica é favorecido, o que vem ocorrendo tanto em humanos quanto em animais vacinados (PISANELLI et al., 2005; GURGEL et al., 2007).

Em crianças, quando a vacina é administrada precocemente, atua na promoção da imunidade natural, mimetizando a infecção primária, mas não ocasionando a doença (GLASS et al., 1997). Em bovinos, os anticorpos maternos derivados passivamente, mesmo em baixos títulos, inibem a síntese de imunoglobulinas em bezerros neonatos e impedem o sucesso da vacinação em animais jovens. Portanto, a vacinação precoce é ineficiente (TIZARD, 2002a). Nesses animais, a vacina é utilizada na vaca, ao final da

gestação, com a intenção de aumentar o título de anticorpos específicos contra o RV no colostro ou leite para proteção do neonato (LU et al., 1994; ALFIERI et al., 2007).

As imunoglobulinas mais abundantes no colostro de bovinos são IgG1 e IgA. Os anticorpos séricos (IgG e IgM) não produzem boa imunidade no recém nascido, diferentemente da IgA, que tem a função de prevenir a aderência de bactérias e vírus na mucosa intestinal e não permitir que o vírus penetre na célula (ALFIERI et al., 2007). A IgA também pode ser transportada através das células intestinais, se ligar com proteínas virais recém sintetizadas, interrompendo desta forma a replicação viral (TIZARD, 2002b).

As vacinas comerciais contra a rotavirose bovina no Brasil são inativadas (*Rotatec J5* Biogenesis [Brasil], *ScourGuard* 3 (K)/C* [Pfizer]) e contêm as cepas de RV-A NCDV-Lincoln (G6P[1]) e B223 (G10P[11]). Essas vacinas são administradas na vaca para transferir imunidade passiva colostrada aos bezerros (BIOGENESIS, 2010; PFIZER, 2010).

Estudos utilizando vacinação com o protótipo G6P[1] de BoRV-A não protegeram contra cepas de RV G6 contendo P diferente da vacina (CLARK et al., 1996; KIM et al., 2002; BARREIROS et al., 2004). Segundo Brito et al. (2000), a vacina contendo o genótipo G6P[1] pode não ser tão eficaz, já que o P[1] pode não ser o genótipo mais encontrado dependendo da região estudada.

No Brasil, Barreiros et al. (2004), estudaram o genótipo mais frequente de RV em bezerros provenientes de rebanhos bovinos em que as vacas eram ou não vacinadas com uma vacina comercial inativada contra o BoRV-A genótipo G6P[1] (protótipo NCDV-Lincoln). Os genótipos recombinantes G6P[11] (34,3%), G8P[11] (22,9%) e G6P[5] (8,6%) foram às combinações mais prevalentes em rebanhos vacinados. Em rebanhos não vacinados os genótipos mais prevalentes foram G6P[1] (33,3%), G6P[5] (27,8%) e G8P[1] (16,7%). Segundo os autores, a vacina não resulta em boa imunidade heteróloga e não é eficiente em proteger contra as diferentes interações dos genótipos P e G, podendo ocorrer a rotavirose mesmo em rebanhos vacinados.

Um estudo semelhante foi realizado no México em que foram coletadas amostras diarreicas de bezerros de 2 a 45 dias de idade, provenientes de rebanhos de corte e leite. O genótipo mais frequente nos animais não vacinados foi G10P[11] (66,7%), G6P[5] (25%) e G10P[5] (8,3%). Nos animais vacinados com vacina comercial inativada NCDV-Lincoln, todas as amostras apresentaram os genótipos G10P[11], demonstrando que vacinas comerciais contendo o genótipo G6P[1] determinaram apenas imunidade parcial contra o genótipo G10P[11] (RODRÍGUES-LIMA et al., 2009).

Alkan et al. (2010) estudaram um surto de diarreia em bezerros de rebanhos vacinados com vacina G6P[1] e G6P[5], em que os animais apresentaram principalmente as cepas G10P[11] e G6P[11] (recombinante), distante da linhagem G6P[1] NCDV-Lincoln (somente 90,1% de identidade em aa). Quanto ao genotipo P (VP4), a pressão imune causada pelos antígenos vacinais pode ter resultado na evasão imunológica.

Lorenzetti et al. (2011) verificaram casos de falha vacinal em leitões vacinados com o genotipo G4P[6] (comum em suínos) que apresentaram diagnóstico positivo para rotavirus também do genotipo G4P[6], porém de origem humana, de outra linhagem e sublinhagem do genotipo suíno. Isto pode ter acarretado em uma imunidade heteróloga insuficiente em proteger contra este genotipo.

Gurgel et al. (2007) descreveram, no Brasil, casos de falha vacinal em crianças que apresentaram doença tão grave quanto às crianças que não foram vacinadas. Phan et al. (2007a,b) estudaram os genotipos de RV mais frequentes em crianças com diarreia no Japão e encontraram o genotipo G1, utilizado nas novas vacinas de RV em humanos.

Porém, esse genotipo foi classificado em outra linhagem e sublinhagem. Além disso, observaram a presença de recombinação intragênica, gerando maior heterogeneidade genética. Esse mecanismo auxilia no escape imunológico por meio de trocas entre segmentos genéticos de diferentes regiões e com antigenicidade distinta, o que pode explicar a falha vacinal que vem ocorrendo.

Falhas vacinais podem ocorrer por várias razões, inclusive pelo manejo vacinal utilizado. Ainda não é bem esclarecido como as divergências antigênicas que ocorrem entre os antígenos vacinais e de campo afetam a eficácia da imunização (ALKAN et al., 2010).

1.16 DIAGNÓSTICO

As técnicas mais utilizadas para o diagnóstico de RV são a eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA), ELISA (teste imunoenzimático) direto, RT-PCR, *multiplex-nested*-PCR e isolamento viral em cultivo celular.

1.16.1 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

A EGPA é uma técnica simples e econômica, tem a característica de identificar o *dsRNA* e determinar o eletroferotipo da cepa viral infectante. Por isso, é uma técnica muito utilizada na rotina de diagnóstico de RV (HERRING et al., 1982). Porém, a EGPA não identifica variações antigênicas nem segmentos genômicos derivados de diferentes espécies animais quando ocorre o ressortimento (PALOMBO, 2002; BUZINARO et al., 2003).

1.16.2 ELISA Direto

A utilização de anticorpo policlonal ou monoclonal de captura para VP6 em sistema de ELISA direto torna o teste específico e sensível para RV-A. O teste pode detectar pequenas quantidades de vírus antes ou depois do aparecimento dos sinais clínicos (BARBOSA et al., 1998).

1.16.3 RT-PCR

A RT-PCR é utilizada tanto para diagnóstico quanto para a realização de estudos comparativos com o objetivo de caracterizar os genótipos G e P, como em estudos que abordam a epidemiologia molecular da infecção e a caracterização de infecções heterólogas e de falhas vacinais. Como desvantagens da RT-PCR, a amplificação genômica pode não ocorrer pela presença de inibidores nas amostras fecais, por problemas de conservação das amostras, infecções virais com baixos títulos ou por problemas na hibridização dos primers com as sequências alvo (HUSSEIN et al., 1996; GARAI COECHEA et al., 2006).

1.16.4 Genotipagem pela Multiplex-Nested-Pcr

A genotipagem é um bom método para detectar os epítomos de neutralização em cepas de campo com a utilização de *primers* específicos para regiões variáveis. A técnica de multiplex-nested-PCR pode detectar outras cepas de genótipos distintos, incluindo as provenientes de diferentes espécies. Além disso, possibilita o sequenciamento do ácido nucléico para confirmação do resultado (GOUVEA et al., 1990). A genotipagem é mais

utilizada do que a sorotipagem porque utiliza reagentes sintéticos universais e apresenta alta sensibilidade (ALFIERI et al., 2004).

A genotipagem das proteínas VP4 e VP7 pode estabelecer uma relação entre genótipos prevalentes em uma região geográfica particular e promover informações sobre a possível origem ou fonte de novas cepas causadoras de surtos de diarreia de RV associados (MONDAL et al., 2011).

1.16.5 Sequenciamento e Análise Filogenética

Análise das sequências dos genes de RV de várias espécies possibilita mostrar a relação genética existente e sugerir um ancestral comum, quando possível, para algumas espécies (PALOMBO, 2002).

1.16.6 Isolamento Viral em Cultivo Celular

O isolamento viral em cultivo celular é utilizado em estudos relacionados às características antigênicas e moleculares das cepas virais circulantes, na produção de antígenos empregados no diagnóstico e na elaboração de vacinas. Não é utilizado como técnica laboratorial de rotina de diagnóstico por ser uma técnica trabalhosa, demorada e exigir a manutenção de linhagens celulares, além de ser onerosa. As culturas de células necessárias para isolamento de RV-A são MA-104 (células renais de macaco *rhesus*) e HT 29 (célula de tumor retal humano) (ALFIERI et al., 2007).

1.17 RELEVÂNCIA DO ESTUDO

A rotavirose clínica com diarreia de grande intensidade pode ser observada tanto em seres humanos quanto em animais (bovinos e suínos) regularmente vacinados (GURGEL et al., 2007; BARREIROS et al., 2004; LORENZETTI et al., 2011). A caracterização molecular de cepas de RV provenientes de casos clínicos em rebanhos vacinados é importante para a compreensão dos mecanismos envolvidos na imunidade homóloga e heteróloga contra os RV, bem como dos mecanismos de evolução do vírus frente à pressão imunológica. Com isso, a ocorrência de infecções heterólogas e as falhas vacinais poderão ser melhor compreendidas. As informações geradas neste trabalho poderão direcionar estudos para o desenvolvimento de vacinas mais eficazes.

1.18 REFERÊNCIAS

- ABE, A.; ITO, N.; MORIKAWA, S.; TAKASU, M.; MURASE, T.; KAWASHIMA, T.; KAWAI, Y.; KOHARA, J.; SUGIYAMA, M. Molecular epidemiology of rotaviruses among healthy calves in Japan: Isolation of a novel bovine rotavirus bearing new P and G genotypes. **Virus Research**, v.144, n.1-2, p.250-257, 2009.
- ABE, M.; ITO, N.; MASATANI, T.; NAKAGAWA, K.; YAMAOKA, S.; KANAMARU, Y.; SUZUKI, H.; SHIBANO, K.; ARASHI, Y.; SUGIYAMA, M. Whole genome characterization of new bovine rotavirus G21P[29] and G24P[33] strains provides evidence for interspecies transmission. **Journal of General Virology**, v.92, n.4, p.952-960, 2011.
- ABIEC, 2010.** Disponível em: <<http://www.abiec.com.br/>>. **Acessado em:** 23 de Março de 2010.
- ABIEC, 2011.** Disponível em: <http://www.abiec.com.br/.3_pecuaria.asp>. **Acessado em:** 15 de Março de 2011.
- ALFIERI, A.F.; BARREIROS, M.A.B.; LEITE, J.P.G.; RICHTZENHAIN, L.J.; ALFIERI, A.A. G and P genotypes of group A rotavirus strains circulating in calves in Brazil, 1996-1999. **Veterinary Microbiology**, v.99, n.3-4, p.167-173, 2004.
- ALFIERI, A.A.; PARAZZI, M.E.; TAKIUCHI, E.; MÉDICI, K. C.; ALFIERI, A. F. Frequency of group A rotavirus in diarrhoeic calves in Brazilian cattle herds, 1998-2002. **Tropical Animal Health Production**, v.38, n.7-8, p.521-526, 2006.
- ALFIERI, A.A. Desafios sanitários para o mercado mundial da carne. In: **A zootecnia frente a novos desafios**, UEL editora, Brasil, p.309-318, 2007.
- ALFIERI, A.A.; ALFIERI, A.F.; TAKIUCHI, E.; LOBATO, Z.I.P. Reoviridae. In: **Virologia Veterinária**, UFSM editora, Brasil, p.773-807, 2007.
- ALKAN, F.; OZKUL, A.; OGUZOGLU, T.C.; TIMURKAN, O.; CALISKAN, E.; MARTELLA, V.; BURGU, I. Distribution of G (VP7) and P (VP4) genotypes of group A bovine rotaviruses from Turkish calves with diarrhea, 1997-2008. **Veterinary Microbiology**, v.141, n.3-4, p.231-237, 2010.
- BÁNYAI, K.; GENTSCH, J.R.; GRIFFIN, D.D.; HOLMES, J.L.; GLASS, R.I.; SZUCS, G. Genetic Variability Among Serotype G6 Human Rotaviruses: Identification of a Novel Lineage Isolated in Hungary. **Journal of Medical Virology**, v.71, n.1, p.124-134, 2003.
- BARBOSA, E.F.; FIGUEIREDO, H.C.P.; GARCIA, A.M.; LOBATO, Z.I.P.; LAGE, A.P. Rotavirus do grupo A em bezerros lactentes no estado de Minas Gerais. **Ciência Rural**, v. 28, n.3, p.435-439, 1998.
- BARREIROS, M.A.B.; ALFIERI, A.F.; MEDICI, K.C.; LEITE, J.P.G.; ALFIERI, A. A. G and P genotypes of group A rotavirus from diarrhoeic calves born to cows vaccinated against the NCDV (P[1], G6) rotavirus strain. **Journal of Veterinary Medicine**, v.51, n.3, p.104-109, 2004.

BENDALI, F.; SANAA, M.; BICHET, H.; SCHELCHER, F. Risk factors associated with diarrhoea in newborn calves. **Veterinary Research**, v.30, n.5, p.509-522, 1999.

BIOGENESIS, 2010. Disponível em <http://www.biogenesisbago.com/brasil/produto_int.php?id=32>. **Acessado em:** 26 de Abril de 2010.

BLUTT, S.E.; KIRKWOOD, C.D.; PARRENO, V.; WARFIELD, K.L.; CIARLET, M.; ESTES, M.K.; BOK, K.; BISHOP, R.F.; CONNER, M.E. Rotavirus antigenaemia and viremia: a common event? **The Lancet**, v.362, n.9394, p.1445-1449, 2003.

BRITO, W.M.E.D.; MUNFORD, V.; VILLAÇA, A.M.; CARUZO, T.A.R.; RÁCZ, M.L. Characterization of mixed infections with different strains of bovine rotavirus in an outbreak of diarrhea in dairy herds in Goiás, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.31, n.2, p.140-145, 2000.

BUZINARO, M.G.; MISTIERI, M.L.A.; CARVALHO, A.A.B.; SAMARA, S.I.; REGITANO, L.C.A.; JEREZ, J.A. Prevalência de rotavirus do grupo A em fezes diarreicas de bezerros de corte em sistemas semi-intensivos de produção. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.55, n.3, p. 266-270, 2003.

BUZINARO, M.G.; SAMARA, S.I.; PEREIRA, E.A.S.; FUENTES, D.B.; OLIVEIRA, M.C.S. Ocorrência dos genótipos G e P de rotavírus do grupo A em bezerros de rebanhos de corte no estado de São Paulo, Brasil. **Arquivo do Instituto Biológico**, v.76, n.1, p.99-105, 2009.

CARUZO, T.A.; BRITO, W.M.; MUNFORD, V.; RÁCZ, M.L. Molecular characterization of G and P-types bovine rotavirus strains from Goiás, Brazil: high frequency of mixed P-type infections. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.105, n.8, p.1040-1043, 2010.

CHANDRAHASAN, C.; GRIMWOOD, K.; REDSHAW, N.; RICH, F.J.; WOOD, C.; STANLEY, J.; KIRMAN, J.R. Geographical differences in the proportion of human group A rotavirus strains within New Zealand during one epidemic season. **Journal of Medical Virology**, v.82, n.5, p.897-902, 2010.

CHANG, K.O.; PARWANI, A.V.; SAIF, L.J. Comparative sequence analysis of the VP7 genes of G6, G8 and G10 bovine group A rotaviruses and further characterization of G6 subtypes. **Archives of Virology**, v.145, n.4, p.725-37, 2000.

CIARLET, M.; HYSER, J.M.; ESTES, M.K. Sequence analysis of the VP4, VP6, VP7, and NSP4 genes products of the bovine rotavirus WC3. **Virus Genes**, v.24, n.2, p.107-118, 2002.

CLARK, K.J.; TAMBORELLO, T.J.; XU, Z.; MANN, F.E.JR.; BONNOT, C.E.; WOODE, G.N. An unusual group-A rotavirus associated with an epidemic of diarrhea among three-month-old calves. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.15, n.208, p.552-554, 1996.

COOK, N.; BRIDGER, J.; KENDALL, K.; GOMARA, M.I.; EL-ATTAR, L.; GRAY, J. The zoonotic potential of rotavirus. **Journal of Infection**, v.48, n.4, p.289-302, 2004.

COONEY, M.A.; GORRELL, R.J.; PALOMBO, E.A. Characterization and phylogenetic analysis of the VP7 proteins of serotype G6 and G8 human rotaviruses. **Journal of Medical Microbiology**, v.50, n.5, p.462-467, 2001.

DE GRAZIA, S.; MARTELLA, V.; ROTOLO, V.; BONURA, F.; MATTHIJNSSENS, J.; BÁNYAI, K.; CIARLET, M.; GIAMMANCO, G.M. Molecular characterization of genotype G6 human rotavirus strains detected in Italy from 1986 to 2009. **Infection, Genetics and Evolution**, v.11, n.6, p.1449-1455, 2011.

DYALL-SMITH, M.L.; LAZDINS, I.; TREGGAR, G.W.; HOLMES, I.H. Location of the major antigenic sites involved in rotavirus serotype-specific neutralization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 83, n.10, p.3465-3468, 1986.

EMPRAPA, 2010. Disponível em <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Leite/LeiteCerrado/referencia.html>> **Acessado em:** 23 de Março de 2010.

ESTES, M.K.; COHEN, J. Rotavirus Gene Structure and Function. **Microbiological Reviews**, v.83, n.4, p.410-449, 1989.

ESTES, M.K. Rotaviruses and their replication. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D. M., HOWLEY, P. M.; CHANOCK, R.M.; MELNICK, J.L.; MONATH, T.P.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S.E. (Ed) **Virology**. Philadelphia: Lippincott & Raven, 1996.

ESTES, M. K. Rotaviruses and their replication. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Ed) **Fields Virology**. 4th ed. Philadelphia: Lippincott & Wilkins, 2001 (adaptado).

ESTES, M.K.; KAPIKIAN, A.Z. Rotaviruses. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (Ed.) **Fields Virology**, 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, p.1918-1974, 2007.

FIJTMAN, N.L.; BARRANDE GUY, M.E.; CORNAGLIA, E.M.; SCHUDEL, A.A. Variations and persistency of electropherotypes of bovine rotavirus field isolates. **Archives of Virology**, v.96, n.3-4, p.275-281, 1987.

FREITAS, P.P.S.; UYEMURA, S.A.; SILVA, D.G.; SAMARA, S.I.; BUZINARO, M.G. Rotavirus bovino: fatores de risco, prevalência e caracterização antigênica de amostras em rebanhos leiteiros no estado de São Paulo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, n.4, p. 820-827, 2011.

FUKAI, K.; SAKAI, T.; HIROSE, M.; ITOU, T. Prevalence of calf diarrhea caused by bovine group A rotavirus carrying G serotype 8 specificity. **Veterinary Microbiology**, v.66, n.4, p.301-311, 1999.

FUKAI, K.; MAEDA, Y.; FUJIMOTO, K.; ITOU, T.K.; SAKAI, T. Changes in the prevalence of rotavirus G and P types in diarrheic calves from the Kagoshima prefecture in Japan. **Veterinary Microbiology**, v.86, n.4, p.343-349, 2002.

FUKAI, K.; TAKAHASHI, T.; TAJIMA, K.; KOIKE, S.; IWANE, K.; INOUE, K. Molecular characterization of a novel bovine group A rotavirus. **Veterinary Microbiology**, v.123, n.1-3, p.217-224, 2007.

GORZIGLIA, M.; GREEN, K.Y.; NISHIKAWA, K.; TANIGUCHI, K.; JONES, R.; KAPIKIAN, A.Z.; CHANOCK, R.M. Sequence of the fourth gene of human rotaviruses recovered from asymptomatic or symptomatic infections. **Journal of Virology**, v.62, n.2, p.2979-2984, 1988.

GORZIGLIA, M.; LARRALDE, G.; KAPIKIAN, A.Z.; CHANOCK, R.M. Antigenic relationships among human rotaviruses as determined by outer capsid protein VP4. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.87, n.18, p.7155-7159, 1990.

GARAICOECHEA, L.; BOK, K.; JONES, L.R.; COMBESSIES, G.; ODEON, A.; FERNANDEZ, F.; PARRENO, V. Molecular characterization of bovine rotavirus circulating in beef and dairy herds in Argentina during a 10-year period (1994-2003). **Veterinary Microbiology**, v.118, n.1-2, p.1-11, 2006.

GHOSH, S.; ALAM, M.M.; AHMED, M.U.; TALUKDAR, R.I.; PAUL, S.K.; KOBAYASHI, N. Complete genome constellation of a caprine group A rotavirus strain reveals common evolution with ruminant and human rotavirus strains. **Journal of General Virology**, v.91, n.9, p.2367-2373, 2010.

GHOSH, S.; GATHERU, Z.; NYANGAO, J.; ADACHI, N.; URUSHIBARA, N.; KOBAYASHI, N. Full genomic analysis of a G8P[1] rotavirus strain isolated from an asymptomatic infant in Kenya provides evidence for an artiodactyl-to-human interspecies transmission event. **Journal of Medical Virology**, v.83, n.2, p.367-376, 2011.

GLASS, R.I.; BRESSE, J.S.; PARASHAR, U.; MILLER, M.; GENTSCH, J.R. Rotavirus vaccines at the threshold. **Nature Medicine**, v.3, n.12, p.1324-1325, 1997.

GOUVEA, V.; GLASS, R.I.; WOODS, P.; TANIGUCHI, K.; CLARK, H.F.; FORRESTER, B.; FANG, Z.Y. Polymerase Chain Reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v.28, n.2, p.276-282, 1990.

GREEN, K.Y.; SEARS, J.F.; TANIGUCHI, K.; MIDTHUN, K.; HOSHINO, Y.; GORZIGLIA, M.; NISHIKAWA, K.; URASAWA, S.; KAPIKIAN, A.Z.; CHANOCK, R.M. Prediction of human rotavirus serotype by nucleotide sequence analysis of the VP7 protein gene. **Journal of Virology**, v.62, n.5, p.1819-1823, 1988.

GREENBERG, H.B.; ESTES, M.K. Rotaviruses: from pathogenesis to vaccination. **Gastroenterology**, v. 136, n.6, p.1939-1951, 2009.

GURGEL, R.Q.; CUEVAS, L.E.; VIEIRA, S.C.F.; BARROS, V.C.F.; FONTES, P.B.; SALUSTINO, E.F.; NAKAGOMI, O.; NAKAGOMI, T.; DOVE, W.; CUNLIFFE, N.; HART, C.A. Predominance of rotavirus P[4]G2 in a vaccinated population, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v.13, n.10, p.1571-1573, 2007.

HARDY, M.E.; WOODE, G.N.; XU, Z.C.; GORZIGLIA, M. Comparative amino acid sequence analysis of VP4 for VP7 serotype 6 bovine rotavirus strains NCDV, B641, and UK. **Journal of Virology**, v.65, n.10, p.5535-5538, 1991.

HERRING, A.J.; INGLIS, N.F.; OJEH, C.K.; SNODGRASS, D.R.; MENZIES, J.D. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. **Journal of Clinical Microbiology**, v.16, n.3, p.473-477, 1982.

HOSHINO, Y.; JONES, R.W.; KAPIKIAN, A.Z. Characterization of neutralization specificities of outer capsid spike protein VP4 of selected murine, lapine, and human rotavirus strains. **Virology**, v.299, n.1, p.62-71, 2002.

HUSSEIN, H.A.; FROST, E.; TALBOT, B.; SHALABY, M.; CORNAGLIA, E.; EL-AZHARY, Y. Comparison of polymerase chain reaction and monoclonal antibodies for G-typing of group A bovine rotavirus directly from fecal material. **Veterinary Microbiology**, v.51, n.1-2, p.11-17, 1996.

IEPEC, 2010. Disponível em: < <http://www.iepec.com/noticia/demanda-mundial-por-carnes-tera-crescimento-acentuado>>. **Acessado em:** 03 de Maio de 2010.

ISHIZAKI, H.; SAKAI, T.; SHIRAHATA, T.; TANIGUCHI, K.; URASAWA, T.; URASAWA, S.; GOTO, H. The distribution of G and P types within isolates of bovine rotavirus in Japan. **Veterinary Microbiology**, v.48, n.3-4, p.367-372, 1996.

JANKE, B.H. Symposium on neonatal calf diarrhea. **Veterinary Medicine**, v.84, p.803-810, 1989.

KIM, Y.; NIELSEN, P.R.; HODGINS, D.; CHANG, K.O.; SAIF, L.J. Lactogenic antibody responses in cows vaccinated with recombinant bovine rotavirus-like particles (VLPs) of two serotypes or inactivated bovine rotavirus vaccines. **Vaccine**, v.15, n.7-8, p.1248-1258, 2002.

KIRKWOOD, C.; MASENDYCH, P.J.; COULSON, B.S. Characteristics and location of cross-reactive and serotype-specific neutralization sites on VP7 of human G type 9 rotaviruses. **Virology**, v.196, n.1, p.79-88, 1993.

LARRALDE, G.; LI, B.G.; KAPIKIAN, A.Z.; GORZIGLIA, M. Serotype-specific epitope(s) present on the VP8 subunit of rotavirus VP4 protein. **Journal of Virology**, v.65, n.6, p.3213-3218, 1991.

LARRALDE, G.; GORZIGLIA, M. Distribution of conserved and specific epitopes on the VP8 subunit of rotavirus VP4. **Journal of Virology**, v.66, n.12, p.7438-7443, 1992.

LORENZETTI, E.; DA SILVA MEDEIROS, T.N.; ALFIERI, A.F.; ALFIERI, A.A. Genetic heterogeneity of wild-type G4P[6] porcine rotavirus strains detected in a diarrhea outbreak in a regularly vaccinated pig herd. **Veterinary Microbiology**, v.29, p.154, n.1-2, p.191-196, 2011.

LU, W.; DUHAMEL, G.E.; DAVID, B.A.; GROTELUESCHEN, D.M. Serological and genotypic characterization of group A rotavirus reassortants from diarrheic calves born to dams vaccinated against rotavirus. **Veterinary Microbiology**, v.42, n.2-3, p.159-170, 1994.

LUCHELLI, A.; LANCE, S.E.; BARTLETT, P.B.; MILLER, G.Y.; SAIF, L.J. Prevalence of bovine group A rotavirus shedding among dairy calves in Ohio. **American Journal of Veterinary Research**, v.53, n.2, p.169-174, 1992.

LUNDGREN, O.; SVENSSON, L. Pathogenesis of rotavirus diarrhea. **Microbes and Infection**, v. 3, n.13, p.1145-1156, 2001.

MAPA, 2011. Disponível em:< <http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/bovinos-e-bubalinos>>. **Acessado em:** 07 de maio de 2011.

MARTELLA, V.; BANYAI, K.; MATTHIJNSSENS, J.; BUONAVOGLIA, C.; CIARLET, M. Zoonotic aspects of rotaviruses. **Veterinary Microbiology**, v.140, n.3-4, p.246-255, 2010.

- MARTELLA, V.; CIARLET, M.; PRATELLI, A.; ARISTA, S.; TERIO, V.; ELIA, G.; CAVALLI, A.; GENTILE, M.; DECARO, N.; GRECO, G.; CAFIERO, M. A.; TEMPESTA, M.; BUONAVOGLIA, C. Molecular analysis of the VP7, VP4, VP6, NSP4, and NSP5/6 genes of a buffalo rotavirus strain: identification of the rare P[3] rhesus rotavirus-like VP4 gene allele. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.12, p.5665-5675, 2003.
- MATTHIJNSSENS, J.; CIARLET, M.; MCDONALD, S.M.; ATTOUI, H.; BANYAI, K.; BRISTER, J.R.; BUESA, J.; ESONA, M.D.; ESTES, M.K.; GENTSCH, J.R.; ITURRIZA-GOMARA, M.; JOHNE, R.; KIRKWOOD, C.D.; MARTELLA, V.; MERTENS, P.P.; NAKAGOMI, O.; PARRENO, V.; RAHMAN, M.; RUGGERI, F.M.; SAIF, L.J.; SANTOS, N.; STEYER, A.; TANIGUCHI, K.; PATTON, J.T.; DESSELBERGER, U.; VAN RANST, M. Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the rotavirus classification working group (RCWG). **Archives of Virology**, v.156, n.8, p.1397-1413, 2011.
- MATTHIJNSSENS, J.; CIARLET, M.; RAHMAN, M.; ATTOUI, H.; BANYAI, K.; ESTES, M.K.; GENTSCH, J.R.; ITURRIZA-GÓMARA, M.; KIRKWOOD, C.D.; MARTELLA, V.; MERTENS, P.P.; NAKAGOMI, O.; PATTON, J.T.; RUGGERI, F.M.; SAIF, L.J.; SANTOS, N.; STEYER, A.; TANIGUCHI, K.; DESSELBERGER, U.; VAN RANST, M. Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. **Archives of Virology**, v.153, n.8, p.1621-1629, 2008a.
- MATTHIJNSSENS, J.; CIARLET, M.; HEIMAN, E.; ARIJS, I.; DELBEKE, T.; MCDONALD, S.M.; PALOMBO, E.A.; ITURRIZA-GOMARA, M.; MAES, P.; PATTON, J.T.; 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. **Journal of Virology**, v.82, n.7, p.3204-3219, 2008b.
- MIDGLEY, S.E.; BANYAI, K.; BUESA, J.; HALAIHEL, N.; HJULSAGER, C.K.; JAKAB, F.; KAPLON, J.; LARSEN, L.E.; MONINI, M.; POLJSK-PRIJATELJ, M.; POTTER, P.; RUGGERI, F.M.; STEYER, A.; KOOPMANS, M.; BOTTIGER, B. Diversity and zoonotic potential of rotaviruses in swine and cattle across Europe. **Veterinary Microbiology**, v.156, n.3-4, p.238-245, 2012.
- MONDAL, A.; AICH, R.; MAJEE, S.; BANNALIKAR, A.S. Determination of bovine rotavirus G serotype by polymerase chain reaction. **Tropical Animal Health Production**, v.44, n.4, p.763-767, 2012.
- MUMMIDI, S.; BROOKS, M.A.; PAUL, P.S.; LYOO, Y.S.; ZABEREZHNY, A.D. The VP4 and VP7 of bovine rotavirus VMRI are antigenically and genetically closely related to P-type 5, G-type 6 strains. **Veterinary Microbiology**, v.51, n.3-4, p.241-255, 1996.
- MUNFORD, V.; SOUZA, E.C.; CARUZO, T.A.R.; MARTINEZ, M.B.; RACZ, M.L. Serological and molecular diversity of human rotavirus en São Paulo, Brasil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, n.3, p.459-466, 2007.
- NISHIKAWA, K.; HOSHINO, Y.; TANIGUCHI, K.; GREEN, K.Y.; GREENBERG, H.B.; KAPIKIAN, A.Z.; CHANOCK, R.M.; GORZIGLIA, M. Rotavirus VP7 epitopes of serotype 3 strains. **Virology**, v.171, n-2, p.503-515, 1989.

- OKADA, N.; MATSUMOTO, Y. Bovine rotavirus G and P types and sequence analysis of the VP7 gene of two G8 bovine rotaviruses from Japan. **Veterinary Microbiology**, v.84, n.4, p.297-305, 2002.
- PALOMBO, E.A. Genetic Analysis of a group A rotaviruses: evidence for interspecies transmission of rotavirus genes. **Virus Genes**, v.24, n.1, p.11- 20, 2002.
- PARWANI, A.V.; LUCHELLI, A.; SAIF, L.J. Identification of group B rotaviruses with short genome electropherotypes from adult cows with diarrhea. **Journal of Clinical Microbiology**, v.34, n.5, p.1303-1305, 1996.
- PAUL, P.S.; LYOO, Y.S. Immunogens of rotaviruses. **Veterinary Microbiology**, v.37, n.3-4, p.299-317, 1993.
- PHAN, T.G.; KHAMRIN, P.; QUANG, T.D.; DEY, S.K.; TAKANASHI, S.; OKITSU, S.; MANEEKARN, N.; USHIJIMA, H. Detection and genetic characterization of group A rotavirus strains circulating among children with acute gastroenteritis in Japan. **Journal of Virology**, v.81, n.9, p.4645-4653; 2007a.
- PHAN, T.G.; OKITSU, S.; MANEEKARN, N.; USHIJIMA, H. Evidence of intragenic recombination in G1 rotavirus VP7 Genes. **Journal of Virology**, v.81, n.18, p.10188-10194, 2007b.
- PATTON, J.T. Structure and function of the rotavirus RNA binding proteins (Review article). **Journal of General Virology**, v.76, n.11, p.2633-2644, 1995.
- PARK, S.H.; SAIF, L.J.; JEONG, C.; LIM, G.K.; PARK, S.I.; KIM, H.H.; PARK, S.J.; KIM, Y.J.; JEONG, J.H.; KANG, M.I.; CHO, K.O. Molecular characterization of novel G5 bovine rotavirus strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v.44, n.11, p.4101-4112, 2006.
- PFIZER, 2010.** Disponível em: <<http://www.pfizersaudeanimal.com.br/bovinos/Bulas/scourguard4KC.pdf>>. **Acessado em:** 26 de Abril de 2010.
- PISANELLI, G.; MARTELLA, V.; PAGNINI, U.; MARTINO, L.D.; LORUSSO, E.; IOVANE, G.; BUONAVOGLIA, C. Distribution of G (VP7) and P (VP4) genotypes in buffalo group A rotaviruses isolated in Southern Italy. **Veterinary Microbiology**, v.110, n.1-2, p.1-6, 2005.
- REIDY, N.; LENNON, G.; FANNING, S.; POWER, E.; O'SHEA, H. Molecular characterization and analysis of bovine rotavirus strains circulating in Ireland 2002-2004. **Veterinary Microbiology**, v.117, n.2-4, p.242-247, 2006.
- RODRÍGUEZ-LIMA, W.A.; FLORES-SAMANIEGO, B.; DE LA MORA, G.; RAMÍREZ, O.T.; PALOMARES, L.A. Genotypification of bovine group A rotavirus in México. **Vaccine**, v.27, n.46, p.6411-6414, 2009.
- ROUGEMONT, A.; KAPLON, J.; LEBON, P.; HUET, F.; DENIS, F.; ALAIN, S.; FOURCADE, L.; GROSJEAN, J.; EL-HAJJE, M.-J.; GENDREL, D.; POTHIER, P. Unexpected substitution of dominant rotavirus G genotypes in French hospitalized children over five consecutive seasons. **European Journal of Microbiology Infectious Diseases**, v.28, n.4, p.403-407, 2009.

SATO, M.; NAKAGOMI, T.; TAJIMA, K.; EZURA, K.; AKASHI, H.; NAKAGOMI, O. Isolation of serotype G8, P[1] bovine rotavirus from adult cattle with diarrhea. **Journal of Clinical Microbiology**, v.35, n.5, p.1266-1268, 1997.

SCHLESINGER, S. **Onde pastar? O gado bovino no Brasil**. Rio de Janeiro, FASE (Federação de Órgãos para Assistência Social e Educacional), p.5-6, 2010.

SHERIF, M.E.; ESONA, M.D.; WANG, Y.; GENTSCH, J.R.; JIANG, B.; GLASS, R.I.; BAKER, S.A.; KLENA, J.D. Detection of the first G6P[14] human rotavirus strain from a child with diarrhea in Egypt. **Infection, Genetics and Evolution**, v.11, n.6, p.1436-1442, 2011.

SNODGRASS, D.R.; FITZGERALD, T.; CAMPBELL, I.; SCOTT, F.M.M.; BROWNING, G.F.; MILLER, D.L.; HERRING, A.J.; GREENBERG, H.B. Rotavirus Serotypes 6 and 10 Predominate in Cattle. **Journal of Clinical Microbiology**, v.28, n.3, p.504-507, 1990.

SWIATEK, D.L.; PALOMBO, E.A.; LEE, A.; COVENTRY, M.J.; BRITZ, M.L.; KIRKWOOD, C.D. Detection and analysis of bovine rotavirus strains circulating in Australian calves during 2004 and 2005. **Veterinary Microbiology**, v.140, n.1-2, p.56-621, 2009.

SUZUKI, Y.; SANEKATA, T.; SATO, M.; TAJIMA, K.; MATSUDA, Y.; NAKAGOMI, O. Relative frequencies of G (VP7) and P (VP4) serotypes determined by polymerase chain reaction assays among Japanese bovine rotaviruses isolated in cell culture. **Journal of Clinical Microbiology**, v.31, n.11, p.3046-3049, 1993.

TIZARD, I.R. Imunidade do feto e no recém nascido. In: **Imunologia Veterinária: uma Introdução**, Roca, Brasil, p.233-246, 2002a.

TIZARD, I.R. Imunidade nas superfícies corpóreas. In: **Imunologia Veterinária: uma Introdução**, Roca, Brasil, p.247-260, 2002b.

VARSHNEY, K.C.; BRIDGER, J.C.; PARSONS, K.R.; COOK, R.; TEUCHER, J.; HALL, G.A. The Lesions of Rotavirus Infection in 1- and 10-day-old Gnotobiotic Calves. **Veterinary Pathology**, v.32, n.6, p.619-627, 1995.

WOODE, G.N.; KELSO, N.E.; SIMPSON, T.F.; GAUL, S.K.; EVANS, L.E.; BABIUK, L. Antigenic relationships among some bovine rotaviruses: serum neutralization and cross-protection in gnotobiotic calves. **Journal of Clinical Microbiology**, v.18, n.2, p.358-364, 1983.

YAMAMOTO, D.; KAWAGUCHIYA, M.; GHOSH, S.; ICHIKAWA, M.; NUMAZAKI, K.; KOBAYASHI, N. Detection and full genomic analysis of G6P[9] human rotavirus in Japan. **Virus Genes**, v.43, n.2, p.215-223, 2011.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Realizar a caracterização molecular do BoRV-A isolado em um surto de diarreia neonatal em um rebanho bovino de corte de criação extensiva regularmente vacinado.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Amplificar, sequenciar e determinar a filogenia dos genes VP7 (G) e VP4 (P) das amostras de BoRV-A;
- Isolar o BoRV-A em cultura celular;
- Realizar a caracterização molecular do genoma completo do BoRV-A por meio da amplificação, sequenciamento e caracterização dos genótipos R (VP1), C (VP2), M (VP3), I (VP6), A (NSP1), N (NSP2), T (NSP3), E (NSP4), H (NSP5/NSP6);
- Realizar análises filogenéticas nos 11 segmentos genômicos do BoRV-A.

3 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

FULL GENOMIC ANALYSIS OF G6P[5] ROTAVIRUS STRAIN ISOLATED FROM A NEONATAL DIARRHEA OUTBREAK IN A VACCINATED BRAZILIAN BEEF CATTLE HERD

3.1 ABSTRACT

The bovine rotavirus group A (BoRV-A) is one of the most important etiologic agents of neonatal diarrhea in calves, causing important economic losses to cattle all over the world. The aim of this study was carry out molecular characterization the BoRV-A isolated from a neonatal diarrhea outbreak in a beef cattle herd with extensive breeding from Mato Grosso do Sul state, Midwest Brazil. The herd was regularly vaccinated against neonatal diarrhea with inactivated commercial vaccine containing BoRV-A genotypes G6P[1] (NCDV-Lincoln) and G10P[11] (B223), and other pathogens, according to manufacturer's instructions. Thirty-one diarrheic fecal samples from calves aged less than 30 days old, were evaluated for the presence of BoRV-A by the technique of silver-stained polyacrylamide gel electrophoresis (ss-PAGE). In 19 (61.9%) samples was possible to identify BoRV-A by ss-PAGE. Of these, 17 were positive by RT-PCR with consensus primers for VP4 and VP7 genes of rotavirus group A (RV-A). A positive sample in ss-PAGE and RT-PCR was isolated on MA-104 cells. Consensus products of VP4 and VP7 genes amplified in 12 samples were selected for the identification of P and G genes by sequencing reaction and in all cases was possible to identify the G6P[5] genotype. One fecal sample was selected for molecular characterization of the VP1-VP3, VP6, NSP1-NSP5/6 genes of RV-A and analysis of nucleotide (nt) revealed that the strain belonged to BoRV-A genotypes G6-P[5]-I2c-R2-C2-A3-M2-N2-T6-E2e-H3A. In the phylogenetic tree for the VP7 gene, the sequences were grouped into a cluster different from the strain G6-IV when compared with the sequences of prototypes UK (G6P[5]) and NCDV-Lincoln (G6P[1]) and, therefore, was proposed to classify them in a new sublineage, tentatively designed G6-IV-e. Although the VP4 gene sequences have the highest homologies with the UK strain, they grouped in a cluster different than the P[5] prototype. In summary, with the exception of the VP4 gene, the BoRV-A sample included in this study shared the same genotypes and lineages for all genes analyzed with the prototype NCDV-Lincoln, present in commercial vaccines. This result confirms the importance of induction of homotypic immunity on the genotype VP4 of the BoRV-A in the development of resistance to infection and clinical signs of neonatal diarrhea in cattle regularly vaccinated against rotaviruses.

Keywords: Calves. Diarrhea. BoRV-A. Genotyping. Vaccine.

3.2 INTRODUCTION

The bovine rotavirus group A (BoRV-A) is one of the main etiological agents of the neonatal diarrhea in calves worldwide. The morbidity and mortality rates of BoRV-A infection are high and causes important direct and indirect economic losses to beef and dairy production (HOLLAND, 1990).

The rotavirus belongs to the *Reoviridae* family, *Rotavirus* genus and is composed by a triple-layered protein capsid. The genome is formed by 11 double-stranded RNA (dsRNA) segments, which codifies six structural proteins (VP1-VP4, VP6 and VP7) and six non-structural proteins (NSP1-NSP6). According to the VP6 protein that composes the middle layer of the viral capsid, the RV is classified in seven distinct serogroups (A-G) (ESTES; KAPIKIAN, 2007).

The VP4 and VP7 proteins of RV-A are located in the outer layer capsid inducing neutralizing antibodies. The antigenic variation of these genes determines the binary RV-A classification in genotypes (ESTES; KAPIKIAN, 2007). At the present, were described 35 different P genotypes (VP4) and 27 G genotypes (VP7) of RV-A in wild and domestic mammals and avian species (MATTHIJNSSENS et al., 2011).

Recently, it was proposed a new classification system based on the eleven genomic RNA segments and the nomenclature considered was G_x-P_[x]-I_x-R_x-C_x-M_x-A_x-N_x-T_x-E_x-H_x for the VP7-VP4-VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5/6 encoding genes, respectively (MATTHIJNSSENS et al., 2008a,b). In 2011, the Rotavirus Classification Working Group defined new genotypes for the genes VP6 (I16), VP1 (R9), VP2 (C9), VP3 (M8), NSP1 (A16), NSP2 (N9), NSP3 (T12), NSP4 (E14), and NSP5/6 (H11) for human and animal rotaviruses (MATTHIJNSSENS et al., 2011).

The more common combination of G and P genotypes found in BoRV-A strains that were isolated from diarrhea episodes in calves are G6P[1] (Nebraska Calf Diarrhea Virus [NCDV]-Lincoln), G10P[11] (B223), G6P[5] (UK), and G8P[1] (A5) (FUKAI et al., 1999; GULATI et al., 1999; FUKAI et al., 2002; SWIATEK et al., 2009; MIDGLEY et al., 2012).

The G6P[5] is reported as a common genotype of BoRV-A found in different studies through the world in dairy and beef cattle herds: Japan (SUZUKI et al., 1993; ISHIZAKI et al., 1996, OKADA; MATSUMOTO, 2002), Ireland (REIDY et al., 2006), Australia (SWIATEK et al., 2009), Argentina (GARAICOECHEA et al., 2006),

Denmark, France, Hungary, Slovenia (MIDGLEY et al., 2012), and Brazil (ALFIERI et al., 2004; BUZINARO et al., 2009; FREITAS et al., 2011).

The RV-A G6 genotype is divided in eight (I-VIII) lineages. The lineages G6-I, G6-VI, and G6-VII contain strains of human origin and the G6-IV, G6-V, and G6-VIII lineages include strains of bovine origin. The G6-II and G6-III contain strains of human and animal origin (RAHMAN et al., 2003; DE GRAZIA et al., 2011). Beside, the lineages G6-I and G6-II are divided in four (I-a, I-b, I-c, and I-d) and five (II-a, II-b, II-c, II-d, and II-e) sublineages, respectively (DE GRAZIA et al., 2011).

In beef and dairy cattle herds the good management and vaccination might be used to prevent the calf infection with BoRV-A (CARUZO et al., 2010). The cows are immunized with inactivated or attenuated vaccine when they are pregnant to increase the production of antibodies in the colostrum and milk, and confer passive immunity in newborn calves (SNODGRASS et al., 1980; LU et al., 1994; BARREIROS et al., 2004).

The aim of this study was to carry out molecular characterization of the full genome sequence of BoRV-A strain detected in diarrheic fecal samples from a neonatal diarrhea outbreak in a vaccinated cattle herd.

3.3 MATERIAL AND METHODS

3.3.1 Herd and Stool Samples

The beef cattle farm was located in Mato Grosso do Sul state, Midwest Brazil. Before parturition, every cow was regularly vaccinated for neonatal diarrhea control with inactivated commercial vaccine containing the BoRV-A genotypes G6P[1] and G10P[11], coronavirus, *Clostridium perfringens* type C and *Escherichia coli* K99, according to manufacturer's instructions.

The herd had an extensive management (pasture), good health and nutritional practices, with batch sizes ranging from 100 to 120 animals. The calves were crossbreeding (Nelore x Angus) and 80% presented diarrhea. All animals with diarrhea were treated parenterally with broad-spectrum antibiotics but were unresponsive to antibiotic therapy and 3% of the animals died.

Between January and September of 2009, 31 diarrheic fecal samples were collected from calves, aged less than 30 days old. The samples were stored at - 20°C until analysis the samples. The samples were evaluated by Ziehl Neelsen modified technique

(HENRIKSEN; POHLENZ, 1981) and by SN-PCR assay (TAKIUCHI et al., 2006) for *Cryptosporidium* spp and bovine coronavirus detection, respectively and presented negative results (data not show).

3.3.2 dsRNA Extraction

Fecal suspension 20% (w/v) in buffer Tris/Ca²⁺ pH 7.4 (50 mM Tris-HCl; 10 mM NaCl; 1.5 mM 2-mercaptoethanol; 3 mM CaCl₂) was homogenized and centrifuged at 2,000 x g for 5 min at 4°C. Aliquots of 500 uL of supernatant were collected and treated with 50 uL SDS (sodium dodecyl sulphate) at a final concentration of 1%. The dsRNA was extracted using a combination of phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1) and silica/guanidinium isothiocyanate methods (ALFIERI et al., 2006). The dsRNA was eluted in 50 uL of ultra pure water, treated with DEPC (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). The extracted dsRNA was stored at - 20°C. BoRV- A strain NCDV-Lincoln (G6P[1]) amplified in MA-104 (Rhesus monkey kidney cells)²⁺ cells was used as positive control and aliquots of buffer Tris-Ca were included as negative control in all RNA extraction procedures.

3.3.3 ss-PAGE

The 31 fecal samples were screened by silver-stained polyacrylamide gel electrophoresis (ss-PAGE) for the presence of RV-A dsRNA according to Herring et al. (1982) and Pereira et al. (1983).

3.3.4 RT-PCR Assay for VP7 and VP4 Genes

The RT-PCR assay was performed using rotavirus VP7 and VP4 consensus primers to determine G and P genotypes in all ss-PAGE positive fecal samples. For the VP7 gene (1062 bp) were used consensus primers Beg9 and End9 described by Gouvea et al. (1990; 1993). For the VP4 gene (876 bp) the primers con2 and con3M were used as described by Gentsch et al. (1992) and Martella et al. (2006).

3.3.5 Multiplex-Nested-PCR

RT-PCR products were submitted to a multiplex-nested-PCR assay for G and P genotypes using a pool of G and P type-specific primers, being a pool for human (G1, G2, G3, G4, G9), (P[4], P[6], P[8], and P[9]), and other pool for animal (G5, G6, G8, G10, G11), (P[1], P[5], P[6], P[7], and P[11]) type-specific primers, designed for prototypes rotavirus strains, as described by Das et al. (1994), Gentsch et al. (1992); and Gouvea et al. (1994a,b).

3.3.6 RT-PCR Assay for VP1-VP3, VP6, and NSP1-NSP5/6 Genes

One positive fecal sample for P and G genotype, designed BRA1532, was selected for analyses. The RT-PCR assay was performed for the genes: VP1 (686 bp), VP2 (686 bp), and VP3 (702 bp) (VARGHESE et al., 2006); VP6 (379 bp) (ITURRIZA-GOMARA et al., 2002); NSP1 (1578 bp), NSP2 (1057 bp), and NSP3 (1077 bp) (MATTHIJNSSENS, personal communication); NSP4 (725 bp) (LEE et al., 2000); and NSP5/6 (596 bp) (MOHAN; ATREYA, 2001).

3.3.7 Analysis of PCR Products

The PCR products were analyzed by electrophoresis in 1-2% agarose gel in TBE buffer (89 mM Tris; 89 mM boric acid; EDTA 2 mM) pH 8.4 containing ethidium bromide (0.5 ug/mL). After electrophoresis at constant voltage (100 V) for 40 min, the gel was visualized under UV light.

3.3.8 Sequencing Analysis

RT-PCR products for VP7 and VP4 genes from 12 BoRV-A samples and products for VP1-VP3, VP6, NSP1-NSP5/6 from one BoRV-A strain, were purified using GFXTM PCR DNA and Gel Band purification commercial kit (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK), quantified with QubitTM fluorometer Quant-iT dsDNA BR assay kit (Invitrogen Life Technologies, Eugene, OR, USA) and analyzed in 1-2% agarose gel electrophoresis with ethidium bromide stained.

The samples were sequenced in ABI 3500 Genetic Analyser (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using the corresponding forward and reverse primers.

The sequence quality analysis and contig assemblage of the RV-A genes sequences were performed with Phred and CAP3 softwares (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>) and the sequences were accepted if base quality was > 20. Similarity searches were verified with sequences deposited in GenBank using the Basic Local Alignment Search Tool - BLAST software (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Multiple and pairwise alignments with strains available in the GenBank were realized in Molecular Evolutionary Genetics Analysis -MEGA software package version 5.05 with the CLUSTAL W (version 1.4) (TAMURA et al., 2011) and sequence identity matrix were performed using BioEdit software version 7.0.8.0. Phylogenetic trees based on the nucleotide sequences were obtained using the neighbor-joining method (SAITOU; NEI, 1987) on the model Kimura two-parameter, using MEGA 5.05 software. The bootstrapping probabilities of each node were calculated using 1000 replications.

All sequences were submitted to GenBank and followed accession numbers: VP4: BRA1503 (JQ943546), BRA1505 (JQ943547), BRA1506 (JQ943548), BRA1510 (JQ943549), BRA1513 (JQ943550), BRA1520 (JQ943551), BRA1522 (JQ943552), BRA1525 (JQ943553), BRA1526 (JQ943554), BRA1527 (JQ943555), BRA1536 (JQ943556); VP7: BRA1503 (JQ943557), BRA1505 (JQ943558), BRA1506 (JQ943559), BRA1510 (JQ943560), BRA1513 (JQ943561), BRA1520 (JQ943562), BRA1522 (JQ943563), BRA1525 (JQ943564), BRA1526 (JQ943565), BRA1527 (JQ943566), BRA1536 (JQ943567); BRA1532 NSP1 (JQ943568), BRA1532 NSP2 (JQ943569), BRA1532 NSP3 (JQ943570), BRA1532 NSP4 (JQ943571), BRA1532 NSP5/6 (JQ943572), BRA1532 VP1 (JQ943573), BRA1532 VP2 (JQ943574), BRA1532 VP3 (JQ943575), BRA1532 VP4 (JQ943576), BRA1532 VP6 (JQ943577), BRA1532 VP7 (JQ943578).

3.3.9 Isolation in MA-104 Cell Culture

One selected ss-PAGE and RT-PCR (VP7 and VP4) positive fecal sample (BRA1520) was treated with trypsin (Gibco Invitrogen Corporation®, Grand Island, New York, USA) for 30 min at 37°C and was inoculated in tubes containing MA-104 cells culture for 1 h in roller using the method described by Fukushio et al. (1981). The infected cell

culture was daily evaluated for cytopathic effect. After four blind passages, the RT-PCR for VP7 and VP4 genes and sequencing analyses were also performed.

3.4 RESULTS

The RV-A was detected in 61.3% (19/31) of diarrheic fecal samples analyzed by ss-PAGE. All sample showed the long eletrophoretic profile.

The RT-PCR assay using consensus primers for RV-A carried out in all ss-PAGE positive samples showed 17 fecal samples positive for VP7 and VP4 genes. The BRA1520 strain isolated in MA-104 cells showed cytopatic effect and amplicons for consensus P and G were detected after the forth passage.

The RT-PCR assay conducted for VP6, VP1-VP3, NSP1-NSP5/6 genes of BoRV-A BRA1532 strain showed amplicons for I-R-C-M-A-N-T-E-H genotypes.

The multiplex-nested-PCR assay with a pool of primers for VP4 genotypes performed in five selected samples identified P[5] genotype in all evaluated samples, with a primer designed for UK-like (G6P[5]) strain. None sample showed amplicon for any G genotype with specific VP7 gene primers used in this study. The BoRV-A sequences obtained by consensus primers showed a difference in four nt when compared with the sequence of UK (G6) strain.

All herein evaluated BoRV-A isolated sequences were highly similar to each other, sharing > 98% nt identities in the VP7 and VP4 gene segments analyzed, indicating a likely clonal origin. Because of that, only two samples were chosen to analysis in the phylogenetic tree of G and P genotypes.

The wild-type Brazilian BoRV-A nucleotide (nt) sequences (obtained with consensus primers) clustered in phylogenetic tree, when compared with 27 G types existent for VP7 gene, with G6 genotype, that prototype is RF strain of bovine origin.

All the twelve sequences of the BoRV-A strains and the strain isolated in MA-104 cells displayed highest nucleotide identity (91.5 to 93.5%) with bovine prototypes of G6-IV lineage (NCDV and UK, respectively) and the strains exhibited smaller nucleotide distance (5.6 to 12.15%) with these prototypes, however they formed a new cluster in the phylogenetic tree. Using the nt distances and phylogenetic tree the lineage G6-IV was divided in sublineages (IV-a; IV-e) and the BoRV-A strain of this diarrhea outbreak was classified as G6-IV-e sublineage (Fig.1).

By analysis of the VP8* portion of VP4 gene, the sequences of the evaluated strains were compared with those RV-A strains representative of all 35 P-genotypes. In the phylogenetic tree, BoRV-A sequences presented highest nucleotide identities (86.7 to 87.3%) with P[5] genotype, prototype UK. The BoRV-A P[5] sequences when compared to other P[5] sequences described sharing higher nucleotide identities (90.0 to 92.5%) with B641-Bo and VMRI-Bo prototypes (Fig.2).

The molecular characterization revealed that the BoRV-A BRA1532 strain belonged to the genotype G6-P[5]-I2c-R2-C2-M2-A3-N2-T6-E2e-H3a for the VP1- VP4, VP6, NSP1-NSP5/6 genes of RV-A (Tab.1).

Table 1 – Previously described prototypes with presented highest nucleotide similarity with wildtype Brazilian G6P[5] BoRV-A strain (BRA1532).

Gene	Genotypes (n)	Genotypes of BRA1532	Percentage of similarity	
			Nucleotide	Strains (prototype)
VP1	R (9)	R2	95.7	WC3-Bo
VP2	C (9)	C2	97.2	WC3-Bo
VP3	M (8)	M2	94.8	NCDV-Bo
VP4	P (35)	P[5]	92.5	VMRI-Bo
VP6	I (16)	I2c	97.8	KJ9-1-Bo
VP7	G (27)	G6-IVe	93.5	UK-Bo
NSP1	A (16)	A3	94.8	NCDV-Bo
NSP2	N (9)	N2	96.5	PTRV-Si
NSP3	T (12)	T6	92.8	RF-Bo
NSP4	E (14)	E2e	93.4	RF-Bo
NSP5/6	H (11)	H3a	98.9	PTRV-Bo

3.5 DISCUSSION

The high rate (61.3%) of diarrheic fecal samples positive for BoRV-A identified in this study with a low sensitive diagnostic technique such ss-PAGE demonstrated that the rotavirus was the etiological agent involved in this neonatal diarrhea outbreak. Additionally the fact that the samples were negative for bovine coronavirus and *Cryptosporidium* spp, that were commons etiological agents of calf diarrhea (BENDALI et al., 1999) reinforces this conclusion (data not show).

The RT-PCR assays succeeded in amplifying the VP7 (G) and VP4 (P) genes with consensus primers in seventeen samples. Two ss-PAGE positive fecal samples were RT-PCR assay negative, despite several attempts. This can be explained by inhibition in fecal samples or mismatches in the target sequence (GARAICOECHEA et al., 2006).

Multiplex-nested-PCR genotyping amplified P (VP4) genotype, but was not successful in amplify any G (VP7) genotype with a pool of primers designed for human and animal origin strains used in this study. The G6 and P[5] genotype-specific primers included in the pool for amplification of G and P type present in animal strains of RV-A were designed to target sequence of UK-like strain (GOUVEA et al., 1994a). The existence of several strains facilitates the accumulation of point mutation, generates genetic diversity and may cause viral evolution, fact that explain the absence of amplification (PALOMBO, 2002; MARTELLA et al., 2003).

The strains belonging to G6 genotype are divided into eight (I-VIII) major lineages based in previous studies (RAHMAN et al., 2003; DE GRAZIA et al., 2011). There is significant homotypic divergence between the RV G6 of human and bovine origin, suggesting the existence of different antigenicity origin between strains G6, as well as the species of origin and P genotype associated (CHANG et al., 2000; COONEY et al., 2001). Phylogenetic analysis of genotypes G6 of RV-A of human and cattle demonstrates that mostly viruses are grouped in the phylogenetic tree according to animal species (COONEY et al., 2001).

The phylogenetic tree for VP7 gene showed that there are differences between the wild-type Brazilian BoRV-A strains and all the analyzed prototypes, including NCDV-Lincoln (G6P[1]) and UK (G6P[5]), because they formed a new cluster. In this survey, the G6 Brazilian sequences clustered only in the G6-IV genotype, a lineage with just bovine origin strains. Although the wild-type G6 genotype of BoRV-A sequences showed high nucleotide identity with G6-IV lineage, the strains formed five different clusters in the phylogenetic tree. It suggests the presence of a new division in sublineages of the G6-IV genotype that, according to the previous nomenclatures, could be tentatively be named as sublineages (IV-a; IV-e). The Brazilian wild-type BoRV-A strains clustered with sublineage G6-IV-e, distant of other strains from sublineages G6-IV (IV-a; IV-d). These analyses were well supported as used by De Grazia et al. (2011) for dividing the G6-I and G6-II lineages of human origin strains in sublineages.

Many cases of réassortaient between strains with genes of human and animal origins has been described (MARTELLA et al., 2010), that facilitates the occurrence of vaccine failure and diarrhea in a different host because the diversity in the genotypes. Many cases of rotavirus vaccine failure have been described. In Brazil it was reported in children (GURGEL et al., 2007) and production animals such as cattle and pig (BARREIROS

et al., 2004; LORENZETTI et al., 2011). In Mexican and Turkey it was described in cattle (RODRÍGUES-LIMA et al., 2009; ALKAN et al., 2010).

The G6 genotype of BoRV-A strains clustered in another sublineage of the prototypes present in the vaccine. The vaccine failure can occur because of the diversity between the same genotypes with different lineage and sublineages (PHAN et al., 2007). According Woode et al. (1983), homologous immunity occurs between the same genotype G6, and when has genotypic difference, even small, is enough to show insufficient protection.

The results for the Brazilian BoRV-A strains for VP4 sequences showed the presence only of P[5] genotype. Once the commercial vaccine contains P[1] and P[11] genotypes, the vaccine failure that resulted in this outbreak was probable caused too by the presence of P[5] genotype. The commercial vaccine with P[1] and P[11] did not show a good heterologous protection against P[5] genotype. Vaccine failures may occur for several reasons, like inappropriate vaccination management, antigenic or genetic diversity (ALKAN et al., 2010), interaction between different P and G genotypes (LU et al., 1994) or recombination between another or less common genotypes (BARREIROS et al., 2004; RODRIGUES-LIMA et al., 2009; ALKAN et al., 2010).

Pressure from commercial vaccines may generate competition, selection or variation between strains (CASHMAN et al., 2010) what can be responsible for introduction or emergence of novel more adapted strains or differences in genotypes (PHAN et al., 2007; CASHMAN et al., 2010).

Alkan et al. (2010) studied an outbreak of diarrhea in calves from herds vaccinated with G6P[1] and G6P[5] genotypes, in which animals were infected with G10P[11] and G6P[11] (recombinant) strains, distant from lineage G6P[1] NCDV-Lincoln. The immune pressure caused by vaccine antigens may have resulted in immune evasion in VP4 gene. Clark et al. (1996), Kim et al. (2002) and Barreiros et al. (2004), studied that vaccination with the prototype G6P[1] of BoRV-A did not protect against strains of RV G6 containing different P genotype from vaccine. According to Brito et al. (2000), the vaccine containing the genotype G6P[1] may not be as effective as the P[1] may not be the most common genotype depending on the region studied.

Lu et al. (1994), demonstrated that different genotypes such as commercial vaccine strain with NCDV-Lincoln (G6P[1]) caused vaccine failure due to poor heterologous protection against a reassortment between B641 (G6P[5]) and B223 (G10P[11]) prototypes. However, Chang et al. (2000) reported that immunity among the different strains G6 comes at

least a bit of heterologous protection against another lineage, even when the genotype P is different.

The molecular characterization of the VP1-VP3, VP6, NSP1-NSP5/6 genes of RV-A, and the nucleotide (nt) analysis revealed that the BoRV-A strain belonged to the genotype more common in strains of bovine origin (DE GRAZIA et al., 2011; MATTHIJNSSENS et al., 2008a,b).

The wild-type Brazilian BoRV-A strain shared the same genotypes and lineages for all the genes analyzed when compared to NCDV-Lincoln strain, present in the vaccine, with the exception of the VP4 gene (UK strain), and the sublineage G6-IV different of the both prototypes. The occurrence of vaccine failure that resulted in this diarrhea outbreak could have occurred by both inefficient heterologous protections by a different sublineage of genotype G6 or by different P genotype. Another possibility is the failure to transfer passive immunity or in management of the herd. All these studies discussed earlier point to these possibilities.

Monitoring G and P genotypes of BoRV-A strains circulating or involved in episodes of calf neonatal diarrhea outbreak in regularly vaccinated cattle herd should be performed more often, with the aim of reaching a comprehensive analysis of both genetic and antigenic diversity of rotavirus strains. It can also be emphasized that the new classification system would also act positively in understanding the reason for the occurrence of vaccine failures. Maybe it was not the case in this study (where variations occurred in G and P genotypes), but this does not diminish the use of this new appliance.

The majority of currently available vaccines or vaccines under development are designed to provide antigenic coverage for globally or regionally important G and /or P types. The rotaviruses have a complex epidemiology and multiple G and P genotypes can circulate simultaneously in a given population (SANTOS; HOSHINO, 2005). According to these results, the polyvalent vaccine may not offer protection against all of the current circulating BoRV-A types. Consequently, without this protection, factors such as calf diarrhea and mortality, high treatment costs and reduced growth rates would not be fully minimized (CASHMAN et al., 2010).

This study could contribute in knowing genotypes involved in vaccine failure and may have significant implications for the development and implementation of an effective next generation rotavirus vaccine. As demonstrated before, the G6P[5] is an important genotype circulating in Brazil and world, and this genotype could be implemented

in a next generation of commercial inactivated vaccines in Brazilian cattle herds for neonatal diarrhea control.

Fig.1 –Phylogenetic tree reconstructed with 926 bp amplicons (nt 60-985) of the VP7 gene of G6 genotype of the Brazilian BoRV-A strains. GenBank accession numbers: PA17/03 (JF793943), PA43/03 (JF793944), Hun7 (AJ488134), B1711 (AF532202), R353 (DQ122400), Se584/98 (EF672609), PA27-GV1/93 (JF793942), PA151/97 (L20881), BP1879/03 (FN665685), RC-18-08 (FJ495133), PA5/89 (JF793945), 111-05-27/05 (EF554142), PA77/02 (JF793946), B10925/97 (EF554120), Cap455 (AY128708), AG6.01/96 (AF207063), ASG6.02 (AF421183), B102 (DQ631815), 10733/01 (AY281360), Hun3/95 (AJ487831), Hun4/96 (AJ487833), RotaTeq-WI79-4/92 (GU565046), NCDV (M12394), UK (X00896), BRV033/90 (U62154), KN-4/93 (D12710), Hun5/97 (EF554109), HP113/87 (DQ003292), HP140/87 (DQ003293), RUBV319 (EF199501), IND (U15000), RF (X65940), Wa (K02033), CIT39A/02 (AY629556), WC3 (AY050272), VMRI (U53924), BRA1520/09, BRA1532/09. The numbers adjacent to the nodes represent the percentage of bootstrap support (1000 replicates) for the clusters. Bootstrap values less than 50% are not shown.

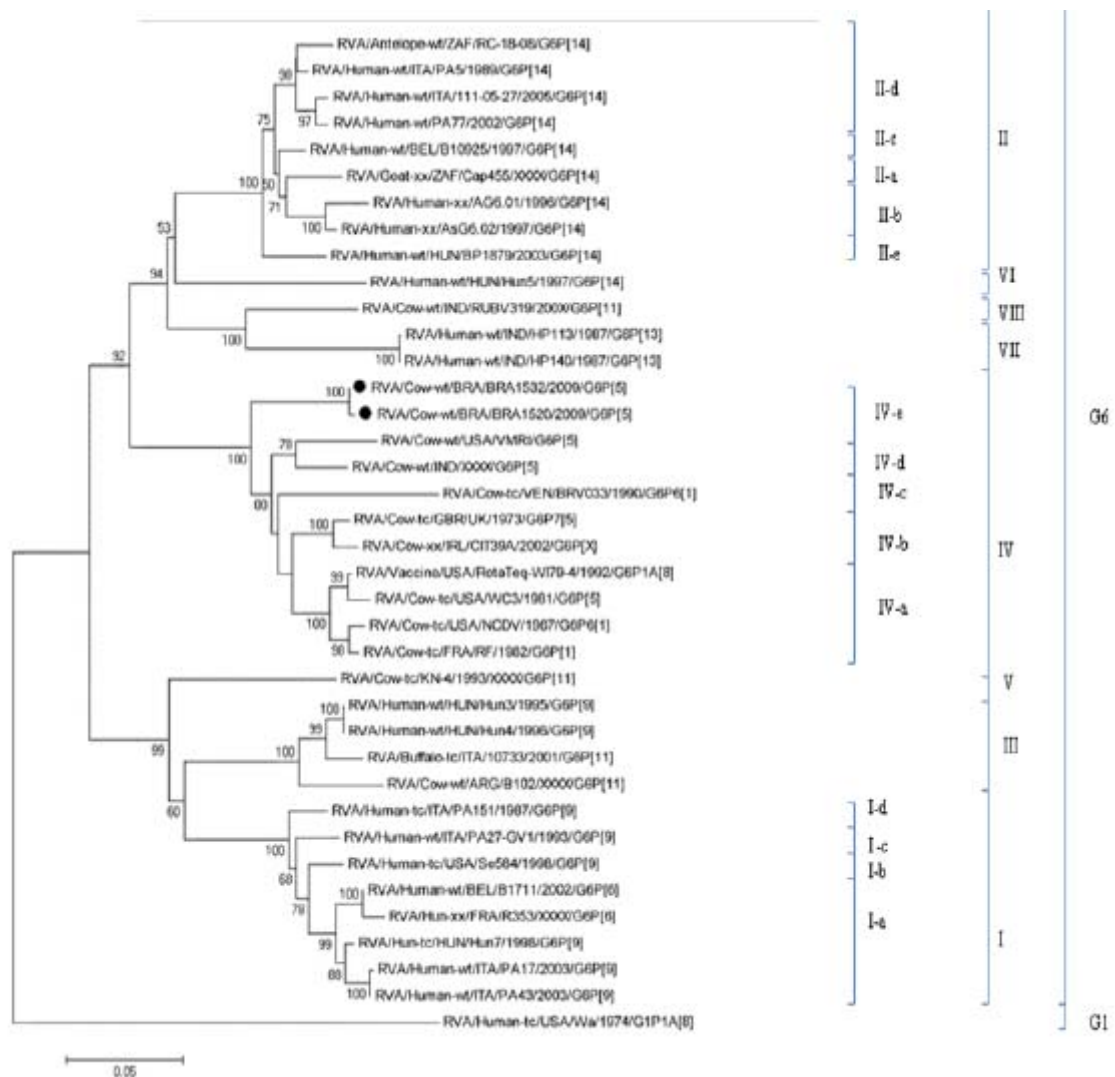
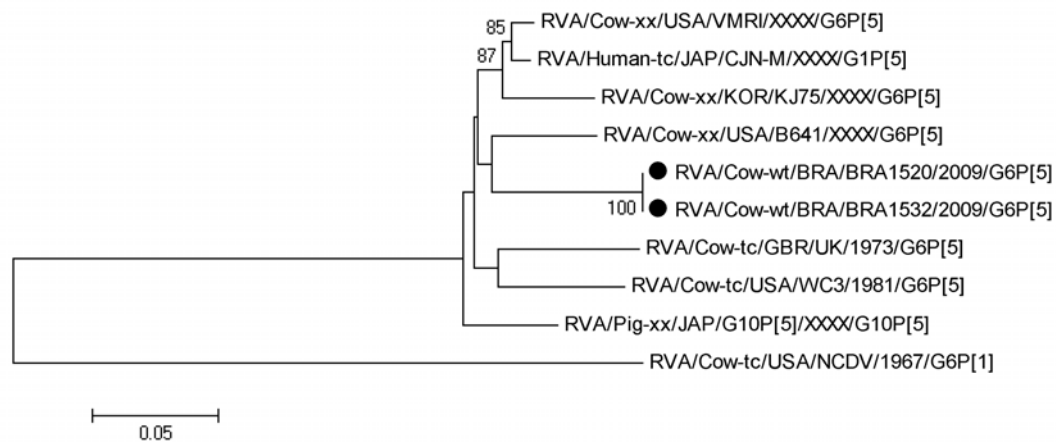


Fig.2 –Phylogenetic tree reconstructed with 691 bp amplicon (nt 46-736) of the VP4 gene the P[5] genotype of the Brazilian BoRV-A strains. GenBank accession numbers: UK (M22306), WC3 (AY050271), VMRI (U53923), CJN-M (D16351), B641 (M63267), G10P5 (U35851), KJ75 (DQ494408), NCDV (AB119636), 61A (D13396), BRA1520/09, BRA1532/09. The numbers adjacent to the nodes represent the percentage of bootstrap support (1000 replicates) for the clusters. Bootstrap values than 50% are not shown.



3.6 REFERENCES

ALFIERI, A.F.; BARREIROS, M.A.B.; LEITE, J.P.G.; RICHTZENHAIN, L.J.; ALFIERI, A.A. G and P genotypes of group A rotavirus strains circulating in calves in Brazil, 1996-1999. **Veterinary Microbiology**, v.99, n.3-4, p.167-173, 2004.

ALFIERI, A.A; PARAZZI, M.E.; TAKIUCHI, E.; MÉDICI, K.C.; ALFIERI, A.F. Frequency of group A rotavirus in diarrhoeic calves in Brazilian cattle herds, 1998-2002. **Tropical Animal Health Production**, v.38, n.7-8, p.521-526, 2006.

ALKAN, F.; OZKUL, A.; OGUZOGLU, T.C.; TIMURKAN, O.; CALISKAN, E.; MARTELLA, V.; BURGU, I. Distribution of G (VP7) and P (VP4) genotypes of group A bovine rotaviruses from Turkish calves with diarrhea, 1997-2008. **Veterinary Microbiology**, v.141, n.3-4, p.231-237, 2010.

BARREIROS, M.A.B.; ALFIERI, A.F.; MÉDICI, K.C.; LEITE, J.P.G.; ALFIERI, A. A. G and P genotypes of group A rotavirus from diarrhoeic calves born to cows vaccinated against the NCDV (P[1], G6) rotavirus strain. **Journal of Veterinary Medicine**, v.51, n.3, p.104-109, 2004.

BENDALI, F.; SANAA, M.; BICHET, H.; SCHELCHER, F. Risk factors associated with diarrhoea in newborn calves. **Veterinary Research**, v.30, n.5, p.509-522, 1999.

- BRITO, W.M.E.D.; MUNFORD, V.; VILLAÇA, A.M.; CARUZO, T.A.R.; RÁCZ, M.L. Characterization of mixed infections with different strains of bovine rotavirus in an outbreak of diarrhea in dairy herds in Goiás, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.31, n.2, p.140-145, 2000.
- BUZINARO, M.G.; SAMARA, S.I.; PEREIRA, E.A.S.; FUENTES, D.B.; OLIVEIRA, M.C.S. Ocorrência dos genótipos G e P de rotavírus do grupo A em bezerros de rebanhos de corte no estado de São Paulo, Brasil. **Arquivo do Instituto Biológico**, v.76, n.1, p.99-105, 2009.
- CARUZO, T.A.; BRITO, W.M.; MUNFORD, V.; RÁCZ, M.L. Molecular characterization of G and P-types bovine rotavirus strains from Goiás, Brazil: high frequency of mixed P-type infections. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.105, n.8, p.1040-1043, 2010.
- CASHMAN, O.; LENNON, G.; SLEATOR, R.D.; POWER, E.; FANNING, S.; O'SHEA, H. Changing profile of the bovine rotavirus G6 population in the south of Ireland from 2002 to 2009. **Veterinary Microbiology**, v.146, n.3-4, p.238-244, 2010.
- CHANG, K.O.; PARWANI, A.V.; SAIF, L.J. Comparative sequence analysis of the VP7 genes of G6, G8 and G10 bovine group A rotaviruses and further characterization of G6 subtypes. **Archives of Virology**, v.145, n.4, p.725-37, 2000.
- CLARK, K.J.; TAMBORELLO, T.J.; XU, Z.; MANN, F.E.JR.; BONNOT, C.E.; WOODE, G.N. An unusual group-A rotavirus associated with an epidemic of diarrhea among three-month-old calves. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.15, n.208, p.552-554, 1996.
- COONEY, M.A.; GORRELL, R.J.; PALOMBO, E.A. Characterization and phylogenetic analysis of the VP7 proteins of serotype G6 and G8 human rotaviruses. **Journal of Medical Microbiology**, v.50, n.5, p.462-467, 2001.
- DAS, B.K.; GENTSCH, J.R.; CICIRELLO, H.G.; WOODS, P.A.; GUPTA, A.; RAMACHANDRAN, M.; KUMAR, R.; BHAN, M.K.; GLASS, R.I. Characterization of Rotavirus Strains from Newborns in New Delhi, India. **Journal of Clinical Microbiology**, v.32, n.7, p.1820-1822, 1994.
- DE GRAZIA, S.; MARTELLA, V.; ROTOLO, V.; BONURA, F.; MATTHIJNSSENS, J.; BÁNYAI, K.; CIARLET, M.; GIAMMANCO, G.M. Molecular characterization of genotype G6 human rotavirus strains detected in Italy from 1986 to 2009. **Infection, Genetics and Evolution**, v.11, n.6, p.1449-1455, 2011.
- ESTES, M.K.; KAPIKIAN, A.Z. Rotaviruses. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (Ed.) **Fields Virology**, 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, p.1918-1974, 2007.
- FREITAS, P.P.S.; UYEMURA, S.A.; SILVA, D.G.; SAMARA, S.I.; BUZINARO, M.G. Rotavírus bovino: fatores de risco, prevalência e caracterização antigênica de amostras em rebanhos leiteiros no estado de São Paulo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, n.4, p. 820-827, 2011.
- FUKAI, K.; SAKAI, T.; HIROSE, M.; ITOU, T. Prevalence of calf diarrhea caused by bovine group A rotavirus carrying G serotype 8 specificity. **Veterinary Microbiology**, v.66, n.4, p.301-311, 1999.

FUKAI, K.; MAEDA, Y.; FUJIMOTO, K.; ITOU, T.K.; SAKAI, T. Changes in the prevalence of rotavirus G and P types in diarrheic calves from the Kagoshima prefecture in Japan. **Veterinary Microbiology**, v.86, n.4, p.343-349, 2002.

FUKUSHYO, A.; SHIMIZU, Y.; ITO, Y. Isolation of cytopathic porcine rotavirus in cell roller culture in the presence of trypsin. **Archives of Virology**, v.69, n.1, p.49-60, 1981.

GARAICOECHEA, L.; BOK, K.; JONES, L.R.; COMBESSIES, G.; ODEÓN, A.; FERNANDEZ, F.; PARRENÓ, V. Molecular characterization of bovine rotavirus circulating in beef and dairy herds in Argentina during a 10-year period (1994-2003). **Veterinary Microbiology**, v.118, n.1-2, p.1-11, 2006.

GENTSCH, J.R.; GLASS, R.I.; WOODS, P.; GOUVEA, V.; GORZIGLIA, M.; FLORES, J.; DAS, B.K.; BHAN, M.K. Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v.30, n.6, p.1365-1373, 1992.

GOUVEA, V.; GLASS, R.I.; WOODS, P.; TANIGUCHI, K.; CLARK, H.F.; FORRESTER, B.; FANG, Z.Y. Polymerase Chain Reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v.28, n.2, p.276-282, 1990.

GOUVEA, V.; RAMIREZ, C.; LI, B.; SANTOS, N.; SAIF, L.J.; CLARK, H.F.; HOSHINO, Y. Restriction endonuclease analysis of the VP7 genes of human and animal rotaviruses. **Journal of Clinical Microbiology**, v.31, n.4, p.917-923, 1993.

GOUVEA, V.; SANTOS, N.; TIMENETSKY, M.C. VP4 typing of bovine and porcine group A rotaviruses by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.32, n.5, p.1333-1337, 1994a.

GOUVEA, V.; SANTOS, N.; TIMENETSKY. Identification of bovine and porcine rotavirus G types by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.32, n.5, p.1338-1340, 1994b.

GULATI, B.R.; NAKAGOMI, O.; KOSHIMURA, Y.; NAKAGOMI, T.; PANDEY, R. Relative frequencies of G and P types among rotaviruses from Indian diarrheic cow and buffalo calves. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, n.6, p.2074-2076, 1999.

GURGEL, R.Q.; CUEVAS, L.E.; VIEIRA, S.C.F.; BARROS, V.C.F.; FONTES, P.B.; SALUSTINO, E.F.; NAKAGOMI, O.; NAKAGOMI, T.; DOVE, W.; CUNLIFFE, N.; HART, C.A. Predominance of rotavirus P[4]G2 in a vaccinated population, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v.13, n.10, p.1571-1573, 2007.

HENRIKSEN, A.; POHLENZ, J.F.L. Staining of *Cryptosporidium* by a modified Ziehl-Nielsen technique. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.22, p.594-596, 1981.

HERRING, A.J.; INGLIS, N.F.; OJEH, C.K.; SNODGRASS, D.R.; MENZIES, J.D. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. **Journal of Clinical Microbiology**, v.16, n.3, p.473-477, 1982.

HOLLAND, R.E. Some infectious causes of diarrhea in young farm animals. **Clinical Microbiology Reviews**, v.3, n.4, p.345-375, 1990.

ISHIZAKI, H.; SAKAI, T.; SHIRAHATA, T.; TANIGUCHI, K.; URASAWA, T.; URASAWA, S.; GOTO, H. The distribution of G and P types within isolates of bovine rotavirus in Japan. **Veterinary Microbiology**, v.48, n. 3-4, p.367-372, 1996.

- ITURRIZA-GOMARA, M.; WONG, C.; BLOME, S.; DESSELBERGER, U.; GRAY, J. Molecular Characterization of VP6 Genes of Human Rotavirus Isolates: Correlation of Genogroups with Subgroups and Evidence of Independent Segregation. **Journal of Virology**, v.76, n.13, p.6596-6601, 2002.
- KIM, Y.; NIELSEN, P.R.; HODGINS, D.; CHANG, K.O.; SAIF, L.J. Lactogenic antibody responses in cows vaccinated with recombinant bovine rotavirus-like particles (VLPs) of two serotypes or inactivated bovine rotavirus vaccines. **Vaccine**, v.15, n.7-8, p.1248-1258, 2002.
- LEE, C-N.; WANG, Y-L.; KAO, C-L.; ZAO, C-L.; LEE, C-Y.; CHEN, H-N. NSP4 Gene Analysis of Rotaviruses Recovered from Infected Children with and without Diarrhea. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, n.12, p. 4471-4477, 2000.
- LORENZETTI, E.; MEDEIROS, T.N.S.; ALFIERI, A.F.; ALFIERI, A.A. Genetic heterogeneity of wild-type G4P[6] porcine rotavirus strains detected in a diarrhea outbreak in a regularly vaccinated pig herd. **Veterinary Microbiology**, v.29, n.1-2, p.191-196, 2011.
- LU, W.; DUHAMEL, G.E.; DAVID, B.A.; GROTELUESCHEN, D.M. Serological and genotypic characterization of group A rotavirus reassortants from diarrheic calves born to dams vaccinated against rotavirus. **Veterinary Microbiology**, v.42, n.2-3, p.159-170, 1994.
- MARTELLA, V.; CIARLET, M.; PRATELLI, A.; ARISTA, S.; TERIO, V.; ELIA, G.; CAVALLI, A.; GENTILE, M.; DECARO, N.; GRECO, G.; CAFIERO, M. A.; TEMPESTA, M.; BUONAVOGLIA, C. Molecular analysis of the VP7, VP4, VP6, NSP4, and NSP5/6 genes of a buffalo rotavirus strain: identification of the rare P[3] rhesus rotavirus-like VP4 gene allele. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.12, p.5665-5675, 2003.
- MARTELLA, V.; CIARLET, M.; BANYAI, K.; LORUSSO, E.; CAVALLI, A.; CORRENTE, M.; ELIA, G.; ARISTA, S.; CAMERO, M.; DESARIO, C.; DECARO, N.; LAVAZZA, A.; BUONAVOGLIA, C. Identification of a novel VP4 genotype carried by a serotype G5 porcine rotavirus strain. **Virology**, v.346, n.2, p.301-311, 2006.
- MARTELLA, V.; BANYAI, K.; MATTHIJNSSENS, J.; BUONAVOGLIA, C.; CIARLET, M. Zoonotic aspects of rotaviruses. **Veterinary Microbiology**, v.140, n.3-4, p.246-255, 2010.
- MATTHIJNSSENS, J.; CIARLET, M.; RAHMAN, M.; ATTOUI, H.; BANYAI, K.; ESTES, M.K.; GENTSCH, J.R.; ITTJRRIZA-GOMARA, M.; KIRKWOOD, C.D.; MARTELLA, V.; MERTENS, P.P.; NAKAGOMI, O.; PATTON, J.T.; RUGGERI, F.M.; SAIF, L.J.; SANTOS, N.; STEYER, A.; TANIGUCHI, K.; DESSELBERGER, U.; VAN RANST, M. Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. **Archives of Virology**, v.153, n.8, p.1621-1629, 2008a.
- MATTHIJNSSENS, J.; CIARLET, M.; HEIMAN, E.; ARIJS, I.; DELBEKE, T.; MCDONALD, S.M.; PALOMBO, E.A.; ITURRIZA-GOMARA, M.; MAES, P.; PATTON, J.T.; 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. **Journal of Virology**, v.82, n.7, p.3204-3219, 2008b.
- MATTHIJNSSENS CIARLET, M.; MCDONALD, S.M.; ATTOUI, H.; BANYAI, K.; BRISTER, J.R.; BUESA, J.; ESONA, M.D.; ESTES, M.K.; GENTSCH, J.R.; ITURRIZA-GÓMARA, M.; JOHNE, R.; KIRKWOOD, C.D.; MARTELLA, V.; MERTENS, P.P.; NAKAGOMI, O.; PARREÑO, V.; RAHMAN, M.; RUGGERI, F.M.; SAIF, L.J.; SANTOS,

N.; STEYER, A.; TANIGUCHI, K.; PATTON, J.T.; DESSELBERGER, U.; VAN RANST, M. Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the rotavirus classification working group (RCWG). **Archives of Virology**, v.156, n.8, p.1397-1413, 2011.

MIDGLEY, S.E.; BANYAI, K.; BUESA, J.; HALAIHEL, N.; HJULSAGER, C.K.; JAKAB, F.; KAPLON, J.; LARSEN, L.E.; MONINI, M.; POLJSK-PRIJATELJ, M.; POTHIER, P.; RUGGERI, F.M.; STEYER, A.; KOOPMANS, M.; BOTTIGER, B. Diversity and zoonotic potential of rotaviruses in swine and cattle across Europe. **Veterinary Microbiology**, v.156, n.3-4, p.238-245, 2012.

MOHAN, K.V.K.; ATREYA, C.D. Nucleotide Sequence Analysis of Rotavirus Gene 11 from Two Tissue Culture-adapted ATCC Strains, RRV and Wa. **Virus Genes**, v.23, n.2, p.321-329, 2001.

OKADA, N.; MATSUMOTO, Y. Bovine rotavirus G and P types and sequence analysis of the VP7 gene of two G8 bovine rotaviruses from Japan. **Veterinary Microbiology**, v.84, n. 4, p.297-305, 2002.

PALOMBO, E.A. Genetic analysis of a group A rotaviruses: evidence for interspecies transmission of rotavirus genes. **Virus Genes**, v.24, n.1, p.11- 20, 2002.

PEREIRA, H.G.; AZEREDO, R.S.; LEITE, J.P.G.; CANDEIAS, J.A.N.; RACZ, M.L.; LINHARES, A.C.; GABBAY, Y.B.; TRABULSI, J.R. Eletrophoretic study of the genome of human rotaviruses from Rio de Janeiro, São Paulo and Belém, Brazil. **International Journal of Hygiene and Enviromental Health**, v.90, n.1, p.117-125, 1983.

PHAN, T.G.; KHAMRIN, P.; QUANG, T.D.; DEY, S.K.; TAKANASHI, S.; OKITSU, S.; MANEEKARN, N.; USHIJIMA, H. Detection and genetic characterization of group A rotavirus strains circulating among children with acute gastroenteritis in Japan. **Journal of Virology**, v.81, n.9, p.4645-4653; 2007.

RAHMAN, M.; DE LEENER, K.; GOEGEBUER, T.; WOLLANTS, E.; VAN DER DONCK, I.; VAN HOOVELS, L.; VAN RANST, M. Genetic characterization of a novel, naturally occurring recombinant human G6P[6] rotavirus. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.5, p.2088-2095, 2003.

REIDY, N.; LENNON, G.; FANNING, S.; POWER, E.; O'SHEA, H. Molecular characterization and analysis of bovine rotavirus strains circulating in Ireland 20022004. **Veterinary Microbiology**, v.117, n.2-4, p.242-247, 2006.

RODRÍGUEZ-LIMA, W.A.; FLORES-SAMANIEGO, B.; DE LA MORA, G.; RAMÍREZ, O.T.; PALOMARES, L.A. Genotypification of bovine group A rotavirus in México. **Vaccine**, v.27, n.46, p.6411-6414, 2009.

SANTOS, N.; HOSHINO, Y. Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. **Reviews in Medical Virology**, v.15, n.1, p.29-56, 2005.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v.4, n.4, p.406-425, 1987.

- SNODGRASS, D.R.; FAHEY, K.J.; WELLS, P.W.; CAMPBELL, I.; WHITELAW, A. Passive immunity in calf rotavirus infections: maternal vaccination increases and prolongs immunoglobulin G1 antibody secretion milk. **Infection and Immunity**, v.28, n.2, p.344-349, 1980.
- SUZUKI, Y.; SANEKATA, T.; SATO, M.; TAJIMA, K.; MATSUDA, Y.; NAKAGOMI, O. Relative frequencies of G (VP7) and P (VP4) serotypes determined by polymerase chain reaction assays among Japanese bovine rotaviruses isolated in cell culture. **Journal of Clinical Microbiology**, v.31, n.11, p.3046-3049, 1993.
- SWIATEK, D.L.; PALOMBO, E.A.; LEE, A.; COVENTRY, M.J.; BRITZ, M.L.; KIRKWOOD, C.D. Detection and analysis of bovine rotavirus strains circulating in Australian calves during 2004 and 2005. **Veterinary Microbiology**, v.140, n.1-2, p.56-62, 2009.
- TAKIUCHI, E.; STIPP, D. T.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI A. A. Improved detection of bovine coronavirus N gene in faeces of calves infected naturally by a semi-nested PCR assay and an internal control. **Journal of Virological Methods**, v.131, n. 2, p.148-154. 2006.
- TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, v.28, n.10, p.2731-2739, 2011.
- VARGHESE, V.; GHOSH, S.; DAS, S.; BHATTACHARYA S.K.; KRISHNAN, T.; KARMAKAR, P.; KOBAYASHI, N.; NAIK, T.N. Characterization of VP1, VP2 and VP3 gene segments of a human rotavirus closely related to porcine strains. **Virus Genes**, v.32, n.3, p.241-247, 2006.
- WOODE, G.N.; KELSO, N.E.; SIMPSON, T.F.; GAUL, S.K.; EVANS, L.E.; BABIUK, L. Antigenic relationships among some bovine rotaviruses: serum neutralization and cross-protection in gnotobiotic calves. **Journal of Clinical Microbiology**, v.18, n.2, p.358-364, 1983.

4 CONCLUSÕES

- O surto de diarreia neonatal descrito nesse estudo foi ocasionado por uma cepa de rotavírus bovino grupo A isolado em cultura celular que revelou-se distinto molecularmente das cepas vacinais (G6P[1] e G10P[11]);
- As análises das sequências de nucleotídeos das proteínas VP7 e VP4 e a reconstrução da árvore filogenética permitiu a caracterização das amostras como G6P[5] linhagem G6-IV, localizada em um *cluster* diferente desta linhagem com relação aos protótipos UK (G6P[5]) e NCDV-Lincoln (G6P[1]);
- O presente estudo possibilitou caracterizar falha vacinal demonstrando que vacinas comerciais contendo as cepas virais G6P[1] (NCDV-Lincoln) e G10P[11] (B223) não promoveram imunidade heteróloga satisfatória contra o genotipo G6P[5] identificado no surto de diarreia neonatal bovina.
- Com relação aos genes VP1-VP3, VP6, NSP1-NSP5/6, as análises moleculares demonstraram que a cepa viral causadora do surto de diarreia neonatal avaliada nesse estudo compartilha os mesmos genótipos com a cepa NCDV-Lincoln, presente na vacina.

ANEXOS

ANEXO A

Lista de Reagentes

1. 2-Mercaptoetanol (C₂H₆O₅) P.M. 78,13 (Fluka®)
2. Acetona, P.A. (CH₃COCH₃) P.M. 58,08 (Dinâmica®)
3. Ácido acético glacial, P.A. (CH₃COOH) P.M. 60,05 (Nuclear®)
4. Ácido bórico (H₃BO₃) P.M. 61,83 (Sicalab®)
5. Ácido clorídrico (HCl) P.M. 36,46 (Reagen®)
6. Ácido etilenodiaminotetraácido sal di-sódico - EDTA, P.A. (C₁₀H₁₄N₂O₈Na₂2H₂O) P.M. 372,24 (Reagen®)
7. Acrilamida P.M. 71,08 (Gibco BRL®)
8. Agar noble (Difco®)
9. Agarose (*Invitrogen™ Life Technologies®*, EUA)
10. Água DEPEC (Dietil pirocarbonato) (*Invitrogen™ Life Technologies®*, EUA)
11. Álcool etílico absoluto (C₂H₂OH) P.M. 46,07 (Nuclear®)
12. Álcool isoamílico ((O[^]CHC[^]C[^]OH) P.M. 88,15 (Synth®)
13. Azul de bromofenol (Sigma[®], EUA)
14. Baytril injetável 10% (Bayer®)
15. Bicarbonato de sódio P.A. (NaHCO₃) P.M. 84,01 (Biotec®)
16. Bis-acrilamida P.M. 154,2 (Sigma®, EUA)
17. Borohidreto de sódio P.M. 37,83 (Sigma®, EUA)
18. Brometo de etídeo (C₂₁H₂₀N₃Br) P.M. 394,3 (Sigma®, EUA)
19. Cloreto de cálcio puro (CaCl₂) P.M. 110,94 (*Invitrogen™ Life Technologies®*, EUA)
20. Cloreto de magnésio 50 mM (MgCl₂) (*Invitrogen™ Life Technologies®*, BRA)
21. Cloreto de potássio, P.A. (KCl) P.M. 74,56 (Reagen®)
22. Cloreto de sódio, P.A. (NaCl) P.M. 58,45 (Reagen®)
23. Clorofórmio, P.A. (CHO₃) P.M. 119,38 (Dinâmica®)
24. Dimetil sulfóxido (DMSO) C₂H₆SO (Sigma®, EUA)
25. Dióxido de sílica (SiO₂) P.M. 60,08 (Sigma®, EUA)
26. DNA Ladder (123 bp) (*Invitrogen™ Life Technologies®*, EUA)
27. dNTP Set (100 mM), 4 x 250 uL; 25 umol each (100 mM dATP Solution, 100 mM dCTP Solution, 100 mM dGTP Solution, 100 mM dTTP Solution) (*Invitrogen™ Life Technologies®*, EUA)

28. Dodecil sulfato de sódio - Lauril Sulfato de Sódio - SDS (C₁₂H₂₅NaO₄S) P.M. 288,38 (Synth[®])
29. Dulbecco's modified eagle medium (Gibco[®])
30. Fenol (C₆H₅OH) P.M. 94,11 (*InvitrogenTM Life Technologies[®]*, EUA)
31. Fosfato de sódio dihidratado (Na₂HPO₄ . 2H₂O) P.M 177,99 (Merck[®])
32. Fosfato de sódio monobásico (NH₂PO₄ . 2H₂O) P.M. 155,99 (Reagen[®])
33. Fosfato de sódio dibásico anidro (Na₂HPO₄) P.M. 141,96 (Synth[®])
34. Fungizona (Anfotericina B) 250ug/mL (Gibco[®])
35. GFXTM PCR DNA and Gel Band purification Kit (GE Healthcare, UK)
36. Glicerol (Gibco BRL[®])
37. Glicina P.A. P.M. 75,07 (Nuclear[®])
38. Glicose C₆H₁₂O₆ P.M. 180,16 (Reagen[®])
39. Hepes buffer solution (1M) (Gibco Invitrogen Corporation[®])
40. Hidróxido de sódio, P.A. (NaOH) P.M. 40,00 (Dinâmica[®])
41. Hidroximetil amino metano - TRIS 99% P.M. 121,14 (Inlab[®])
42. Isotiocianato de guanidina P.M. 118,16 (Gibco BRL[®])
43. L - glutamina (Gibco Invitrogen Corporation[®])
44. Metanol P.A. (CH₃OH) P.M. 32,04 (Allkimia[®])
45. Nitrato férrico
46. Oligonucleotideo iniciador (*primer*) con3M (P) (forward; 5'-GGCTATAAAATGGCTTCGCTCATTTATAGACA -3'; nucleotide (nt) 11-32) Martella et al. (2006) - 200 pmol (*InvitrogenTM Life Technologies[®]*, EUA)
47. Oligonucleotideo iniciador (*primer*) Con2 (P) (reverse; 5'-ATTTCCGGACCATTATAACC -3'; nucleotide (nt) 868-887) Gentsch et al. (1992) - 200 pmol (*InvitrogenTM Life Technologies[®]*, EUA)
48. Oligonucleotideo iniciador (*primer*) Beg9 (G) (forward; 5'-GGCTTTAAAAGAGAGAATTTCCGTCTGG -3'; nucleotide (nt) 1-28) Gouvea et al. (1990) - 200 pmol (*InvitrogenTM Life Technologies[®]*, EUA[®])
49. Oligonucleotideo iniciador (*primer*) End9 (UK) (G) (reverse; 5'-GGTCACATCATACTAATCT -3'; nucleotide (nt) 1062-1039) Gouvea et al. (1993) - 200 pmol (*InvitrogenTM Life Technologies[®]*, EUA)
50. Oligonucleotideo iniciador (*primer*) End9 (CRW8) (G) (reverse; 5'-GGTCACATCTTACAGCTTTAACCT -3'; nucleotide (nt) 1059-1036) Gouvea et al. (1993) - 200 pmol (*InvitrogenTM Life Technologies[®]*, EUA)

51. Oligonucleotideo iniciador (*primer*) End9 (G) (reverse; 5'-GGTCACATCATAACAATTCTAATCTAAG -3'; nucleotide (nt) 1062-1036) Gouvea et al. (1993) - 200 pmol (*InvitrogenTM Life Technologies[®]*, EUA)
52. Oligonucleotideo iniciador (*primer*) sBeg9 (G humano e animal) (forward; 5'-GGCTTTAAAAGAGAGAATTTC -3'; nucleotide (nt) 1-21) Gouvea et al. (1994a) 200 pmol (*InvitrogenTM Life Technologies[®]*, EUA)
53. Oligonucleotideo iniciador (*primer*) 9T1-1 (G1 humano) (reverse; 5'-TCTTGTCAAAGCAAATAATG -3'; nucleotide (nt) 176-195) Das et al. (1994) -200 pmol (*InvitrogenTM Life Technologies[®]*, EUA)
54. Oligonucleotideo iniciador (*primer*) 9T1-2 (G2 humano) (reverse; 5'-GTTAGAAATGATTCTCCACT -3'; nucleotide (nt) 262-281) Das et al. (1994) -200 pmol (*InvitrogenTM Life Technologies[®]*, EUA)
55. Oligonucleotideo iniciador (*primer*) 9T-3P (G3 humano) (reverse; 5'-GTCCAGTTGCAGTGTTAGC -3'; nucleotide (nt) 484-503) Das et al. (1994) - 200 pmol (*InvitrogenTM Life Technologies[®]*, EUA)
56. Oligonucleotideo iniciador (*primer*) 9T-4 (G4 humano) (reverse; 5'-GGGTCGATGGAAAATTCT -3'; nucleotide (nt) 423-440) Das et al. (1994) - 200 pmol (*InvitrogenTM Life Technologies[®]*, EUA)
57. Oligonucleotideo iniciador (*primer*) 9T-9B (G9 humano) (reverse; 5'-TATAAAGTCCATTGCAC -3'; nucleotide (nt) 131-147) Das et al. (1994) - 200 pmol (*InvitrogenTM Life Technologies[®]*, EUA)
58. Oligonucleotideo iniciador (*primer*) FT5 (G5 animal) (reverse; 5'-CATGTACTCGTTGTTACGTC -3'; nucleotide (nt) 779-760) Gouvea et al. (1994a) - 200 pmol (*InvitrogenTM Life Technologies[®]*, EUA)
59. Oligonucleotideo iniciador (*primer*) DT6 (G6 animal) (reverse; 5'-CTAGTTCCTGTGTAGAATC -3'; nucleotide (nt) 499-481) Gouvea et al. (1994a) - 200 pmol (*InvitrogenTM Life Technologies[®]*, EUA)
60. Oligonucleotideo iniciador (*primer*) HT8 (G8 animal) (reverse; 5'-CGGTTCCGGATTAGACAC -3'; nucleotide (nt) 273-256) Gouvea et al. (1994a) - 200 pmol (*InvitrogenTM Life Technologies[®]*, EUA)
61. Oligonucleotideo iniciador (*primer*) ET10 (G10 animal) (reverse; 5'-TTCAGCCGTTGCGACTTC -3'; nucleotide (nt) 714-697) Gouvea et al. (1994a) -200 pmol (*InvitrogenTM Life Technologies[®]*, EUA)

62. Oligonucleotideo iniciador (*primer*) BT11 (G11 animal) (reverse; 5'-GTCATCAGCAATCTGAGTTGC -3'; nucleotide (nt) 336-316) Gouvea et al. (1994a) - 200 pmol (*InvitrogenTM Life Technologies®*, EUA)
63. Oligonucleotideo iniciador (*primer*) 2T1 (P[4] humano) (reverse; 5'-CTATTGTTAGAGGTTAGAGTC -3'; nucleotide (nt) 474-494) Gentsch et al. (1992) - 200 pmol (*InvitrogenTM Life Technologies®*, EUA)
64. Oligonucleotideo iniciador (*primer*) 1T1 (P[8] humano) (reverse; 5'-TCTACTTGGATAACGTGC -3'; nucleotide (nt) 339-356) Gentsch et al. (1992) -200 pmol (*InvitrogenTM Life Technologies®*, EUA)
65. Oligonucleotideo iniciador (*primer*) pNCDV (P[1] animal) (reverse; 5'-CGAACGCGGGGGTGGTAGTTG -3'; nucleotide (nt) 269-289) Gouvea et al. (1994b) - 200 pmol (*InvitrogenTM Life Technologies®*, EUA)
66. Oligonucleotideo iniciador (*primer*) pUK (P[5] animal) (reverse; 5'-GCCAGGTGTCGCATCAGAG -3'; nucleotide (nt) 336-354) Gouvea et al. (1994b) - 200 pmol (*InvitrogenTM Life Technologies®*, EUA)
67. Oligonucleotideo iniciador (*primer*) pGott (P[6] animal) (reverse; 5'-GCTTCAACGTCCTTTAACATCAG -3'; nucleotide (nt) 465-487) Gouvea et al. (1994b) - 200 pmol (*InvitrogenTM Life Technologies®*, EUA)
68. Oligonucleotideo iniciador (*primer*) pOSU (P[7] animal) (reverse; 5'-CTTTATCGGTGGAGAATACGTCAC -3'; nucleotide (nt) 389-412) Gouvea et al. (1994b) - 200 pmol (*InvitrogenTM Life Technologies®*, EUA)
69. Oligonucleotideo iniciador (*primer*) pB223 (P[11] animal) (reverse; 5'-GGAACGTATTCTAATCCGGTG -3'; nucleotide (nt) 574-594) Gouvea et al. (1994b) - 200 pmol (*InvitrogenTM Life Technologies®*, EUA)
70. Oligonucleotideo iniciador (*primer*) VP1F (RVA) (VP1) (sense; 5'-GGCTATTAAAGCTGTACAATGGG -3'; nucleotide (nt) 1-23) Varghese et al. (2006) - 200 pmol (*InvitrogenTM Life Technologies®*, EUA)
71. Oligonucleotideo iniciador (*primer*) VP1IR (RVA) (VP1) (reverse; 5'-TAATCCTCATGAGAAAACACTGAC -3'; nucleotide (nt) 663-686) Varghese et al. (2006) - 200 pmol (*InvitrogenTM Life Technologies®*, EUA)
72. Oligonucleotideo iniciador (*primer*) VP2F (RVA)(VP2) (sense; 5'-GGCTATTAAAGGCTCAATGGCG -3'; nucleotide (nt)1-22) Varghese et al. (2006) - 200 pmol (*InvitrogenTM Life Technologies®*, EUA)

73. Oligonucleotideo iniciador (*primer*) VP2IR (RVA)(VP2) (reverse; 5'-CTTCATCTTGAAATATAGCATCAC -3'; nucleotide (nt) 663-686) Varghese et al. (2006) - 200 pmol (*InvitrogenTMLife Technologies®*, EUA)
74. Oligonucleotideo iniciador (*primer*) VP3F (RVA) (VP3) (sense; 5'-GGCTATTAAGCAGTACCAGTAG -3'; nucleotide (nt) 1-23) Varghese et al. (2006) - 200 pmol (*InvitrogenTMLife Technologies®*, EUA)
75. Oligonucleotideo iniciador (*primer*) VP3IR (RVA) (VP3) (reverse; 5'-GTAAACATAGATTCATTACGCGGACC -3'; nucleotide (nt) 677-702) Varghese et al. (2006) - 200 pmol (*InvitrogenTMLife Technologies®*, EUA)
76. Oligonucleotideo iniciador (*primer*) VP6-F (RVA) (VP6) (sense; 5'-GACGGVGCRACTACATGGT -3'; nucleotide (nt) 747-766) Iturriza-Gomara et al. (2002) - 200 pmol (*InvitrogenTMLife Technologies®*, EUA)
77. Oligonucleotideo iniciador (*primer*) VP6-R (RVA) (VP6) (reverse; 5'-GTCCAATTCATNCCTGGTGG -3'; nucleotide (nt) 1126-1106) Iturriza-Gomara et al. (2002) - 200 pmol (*InvitrogenTMLife Technologies®*, EUA)
78. Oligonucleotideo iniciador (*primer*) NSP1-F (RVA) (NSP1) (sense; 5'-GGCTTTTTTTTATGAAAAGTCTTG -3'; nucleotide (nt) 1-23) Matthijnssens, personal communication - 200 pmol (*InvitrogenTMLife Technologies®*, EUA)
79. Oligonucleotideo iniciador (*primer*) NSP1-R (RVA) (NSP1) (reverse; 5'-GGTCACATTTTATGCTGCC -3'; nucleotide (nt) 1560-1578) Matthijnssens, personal communication - 200 pmol (*InvitrogenTMLife Technologies®*, EUA)
80. Oligonucleotideo iniciador (*primer*) NSP2-F (RVA) (NSP2) (sense; 5'-GGCTTTTAAAGCGTCTCAG -3'; nucleotide (nt) 1-19) Matthijnssens, personal communication - 200 pmol (*InvitrogenTMLife Technologies®*, EUA)
81. Oligonucleotideo iniciador (*primer*) NSP2-R (RVA) (NSP2) (reverse; 5'-GGTCACATAAGCGCTTTC -3'; nucleotide (nt) 1041-1057) Matthijnssens, personal communication - 200 pmol (*InvitrogenTMLife Technologies®*, EUA)
82. Oligonucleotideo iniciador (*primer*) NSP3-F (RVA) (NSP3) (sense; 5'-GGCTTTTAATGCTTTTCAGTG -3'; nucleotide (nt) 1-21) Matthijnssens, personal communication - 200 pmol (*InvitrogenTMLife Technologies®*, EUA)
83. Oligonucleotideo iniciador (*primer*) NSP3-R (RVA) (NSP3) (reverse; 5'-ACATAACGCCCTATAGC -3'; nucleotide (nt) 1056-1073) Matthijnssens, personal communication - 200 pmol (*InvitrogenTMLife Technologies®*, EUA)

84. Oligonucleotideo iniciador (*primer*) 10BEG.16 (RVA) (NSP4) (sense; 5'-TGTTCCGAGAGAGCGCGTG -3'; nucleotide (nt) 16-34) Lee et al. (2000) - 200 pmol (*Invitrogen™ Life Technologies®*, EUA)
85. Oligonucleotideo iniciador (*primer*) 10END.722 (RVA) (NSP4) (reverse 5'-GACCATTCCTTCCATTAAC -3'; nucleotide (nt) 722-740) Lee et al. (2000) - 200 pmol (*Invitrogen™ Life Technologies®*, EUA)
86. Oligonucleotideo iniciador (*primer*) NSP5/NSP6-F (RVA) (NSP5/6) (sense 5'-GGCTTTAAAAGCGCATAGTGATGT -3'; nucleotide (nt) 22-46) Mohan e Atreya (2001) - 200 pmol (*Invitrogen™ Life Technologies®*, EUA)
87. Oligonucleotideo iniciador (*primer*) NSP5/NSP6-r (RVA) (NSP5/6) (reverse 5'-GGTCACAAAACGGGAGTGGGGGAG -3'; nucleotide (nt) 618-594) Mohan e Atreya (2001) - 200 pmol (*Invitrogen™ Life Technologies®*, EUA)
88. PCR-buffer (10x) (200 mM Tris-HCl, pH 8.4, 500 mM KCl) (*Invitrogen™ Life Technologies®*, BRA)
89. *Platinum Taq DNA Polymerase recombinant* 500 unidades (*Invitrogen™ Life Technologies®*, BRA)
90. Qubit™ Fluorometer (*Invitrogen™ Life Technologies*, EUA)
91. RT-Buffer (5x) (250 mM Tris-HCl pH 8.3, 15 mM MgCh, 375 mM KCl) (*Invitrogen™ Life Technologies®*, BRA)
92. Sacarose, P.A. - sucrose (C12H22O11) P.M. 342,31 (Reagen®)
93. Soro fetal bovino
94. *Superscript™ II RNase H - Reverse Transcriptase* - 200 unidades/uL (*Invitrogen™ Life Technologies®*, EUA)
95. Thermo Sequenase™ II DNA Polymerase and the DYEnamic™ ET Dye Terminator Kit (GE Healthcare)
96. Tripsina (1:250) (Gibco *Invitrogen Corporation®*)
97. Triton x-100
98. Vermelho de fenol C19H14O5S P.M. 354,38 (Reagen®)

ANEXO B

Protocolo de Técnicas

- **Extração bruta - Suspensão fecal**

- Pesar 1 g do material fecal em balança de precisão
- Adicionar 9 mL de tampão TRIS/Ca⁺⁺ 1x (para amostra líquidas estabelecer a proporção 1:2)
- Homogeneizar
- Calibrar os tubos
- Centrifugar 2.000 x g/ 5 min
- Recolher sobrenadante
- Identificar e estocar em frascos a 4°C

- **Extração do ácido nucléico pela associação das técnicas de fenol/clorofórmio -álcool isoamílico e sílica/isotiocianato de guanidina**

1 Suspensão fecal - extração bruta

- 100 µL ou 100 mg de fezes
- 500 µL de tampão TRIS/Ca⁺⁺ 1x
- Homogeneizar em vórtex
- Centrifugar a 2000 x g / 5 min
- Utilizar 500 µL do sobrenadante para extração

2 Extração do RNA

Fase I – Fenol

- Aliquotar 500 µL da suspensão fecal
- Adicionar 50 µL de SDS 10 %
- Homogeneizar em vórtex
- Banho-maria 56 °C /20 min

- Centrifugar 10.000 x g /30 s
- Adicionar 500 uL de fenol/clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1)
- Homogeneizar em vórtex
- Banho-maria 56 °C /15 min
- Homogeneizar em vórtex
- Centrifugar 10.000 x g /10 min
- Recolher o sobrenadante em outro microtubo

Fase II - Sílica / isotiocianato de guanidina

- Adicionar 500 uL da solução L6
- Adicionar 25 uL de sílica hidratada
- Homogeneizar em vórtex
- Agitar em temperatura ambiente /30 min
- Centrifugar 10.000 x g /30 s
- Desprezar o sobrenadante em solução contendo NaOH 10 M
- Adicionar 500 uL de solução L2
- Homogeneizar em vórtex
- Centrifugar 10.000 x g /30 s
- Desprezar o sobrenadante em solução contendo NaOH 10M
- Adicionar 500 uL de solução L2
- Homogeneizar em vórtex
- Centrifugar 10.000 x g /30 s
- Desprezar o sobrenadante em solução contendo NaOH 10M
- Adicionar 500 uL de etanol 70% gelado
- Homogeneizar em vórtex
- Centrifugar 10.000 x g /30 s
- Desprezar sobrenadante em descarte comum
- Adicionar 500 uL de etanol 70% gelado
- Homogeneizar em vórtex
- Centrifugar 10.000 x g /30 s
- Desprezar sobrenadante em descarte comum
- Adicionar 1000 uL de acetona P.A. gelada
- Homogeneizar em vórtex

- Centrifugar 10.000 x g /30 s
- Desprezar sobrenadante em descarte comum
- Secar *opellet* em termo bloco à 60°C (aproximadamente 2 min) ou banho-maria à 56°C (15 min)
- Adicionar 50 μ L de água DEPEC
- Homogeneizar em vórtex
- Banho-maria 56°C/15 min
- Homogeneizar em vórtex
- Centrifugar 13.000 x g /4 min
- Recolher o sobrenadante em microtubo de 500 μ L
- Estocar à 4°C ou -20°C até a utilização

- **Oligonucleotídeos iniciadores - Primers**

Quadro 1 – *Primers* consensuais positivos e negativos utilizados para realização da PCR dos genótipos P e G de rotavírus bovino grupo A e o respectivo tamanho molecular do produto gerado.

Genótipo	<i>Primer</i>		Posição / Polaridade	Produto pb	Referência
	consensual	Sequência			
G	Beg9	GGCTTTAAAAGAGAGAATTTCCGTCTGG	1-28 (+)	1062	(1)
	End9 (UK)	GGTCACATCATACTAATCT	1062-1039 (-)	1062	(2)
	End9 (CRW8)	GGTCACATCTTACAGCTTTAACCT	1059-1036 (-)	1062	(2)
	End 9	GGTCACATCATACTAATCTAAG	1062-1036 (-)	1062	(1)
P	Con3M	GGCTATAAAATGGCTTCGCTCATTATA GACA	11-32 (+)	877	(3)
	Con2	ATTTCCGGACCATTTATAACC	868-887 (-)	877	(4)

(1) Gouvea et al., 1990. (2) Gouvea et al., 1993. (3) Martella et al., 2006. (4) Gentsch et al., 1992.

Quadro 2 – *Primers* positivos e negativos utilizados para realização da *semi-nested-PCR* dos genótipos G humano e animal de rotavírus bovino grupo A e o respectivo tamanho molecular do produto gerado.

Genótipo	Primer	Sequência	Posição / Polaridade	Produto bp	Referência
G humano	sBeg9	GGCTTTAAAAGAGAGAATTC	1-21 (+)	1062	(2)
G1	9T1-1	TCTTGTCAAAGCAAATAATG	176-195 (-)	158	(1)
G2	9T1-2	GTTAGAAATGATTCTCCACT	262-281 (-)	244	(1)
G3	9T-3P	GTCCAGTTGCAGTGTTAGC	484-503 (-)	466	(1)
G4	9T-4	GGGTCGATGGAAAATTCT	423-440 (-)	403	(1)
G9	9T-9B	TATAAAGTCCATTGCAC	131-147 (-)	110	(1)
G animal	sBeg9	GGCTTAAAGAGAGAATTC	1-21 (+)	1062	(2)
G5	FT5	CATGTACTCGTTGTTACGTC	779-760(-)	742 bp	(2)
G6	DT6	CTAGTTCCTGTGTAGAATC	499-481(-)	500 bp	(2)
G8	HT8	CGGTTCCGGATTAGACAC	273-256(-)	274 bp	(2)
G10	ET10	TTCAGCCGTTGCGACTTC	714-697(-)	715 bp	(2)
G11	BT11	GTCATCAGCAATCTGAGTTGC	336-316(-)	337 bp	(2)

(1) Das et al.,1994. (2) Gouvea et al., 1994a.

Quadro 3 – *Primers* positivos e negativos utilizados para realização da *semi-nested-PCR* dos genótipos P humano e animal de rotavírus bovino grupo A e o respectivo tamanho molecular do produto gerado.

Genótipo	Primer	Sequência	Posição / Polaridade	Produto PB	Referência
P humano	Con3M	GGCTATAAAAATGGCTTCGCTCATTTA TAGACA	11-32 (+)	877	(1)
P[4]	2T1	CTATTGTTAGAGGTTAGAGTC	474-494 (-)	483	(2)
P[8]	1T1	TCTACTTGGATAACGTGC	339-356 (-)	345	(2)
P animal	con2	ATTTCGGACCATTTATAACC	11-32 (-)	876	(2)
P[1]	pNCDV	CGAACGCGGGGGTGGTAGTTG	269-289(+)	877	(3)
P[5]	pUK	GCCAGGTGTCGCATCAGAG	336-354(+)	552	(3)
P[6]	pGott	GCTTCAACGTCCTTTAACATCAG	465-487(+)	423	(3)
P[7]	pOSU	CTTTATCGGTGGAGAATACGTCAC	389-412(+)	502	(3)
P[11]	pB223	GGAACGTATTCTAATCCGGTG	574-594(+)	314	(3)

(1) Martella et al., 2006. (2) Gentsch et al., 1992. (3) Gouvea et al., 1994b.

Quadro 4 – Primers utilizados para RT-PCR dos genes VP1-VP3, VP6, NSP1-NSP5/6 de BoRV-A e o respectivo tamanho molecular do produto gerado.

Gene	Primer	Seqüência (5'-3')	Polaridade	Posição (nt)	Produto (pb)	Referência
VP1	VP1F	GGCTATTAAGCTGTACAATGGG	(+)	1-23	686	Varghese et al., 2006
	VP1R	TAATCCTCATGAGAAAACACTGAC	(-)	663-686		
VP2	VP2F	GGCTATTAAGGCTCAATGGCG	(+)	1-22	686	Varghese et al., 2006
	VP2R	CTTCATCTTGAAATATAGCATCAC	(-)	663-686		
VP3	VP3F	GGCTATTAAGCAGTACCAGTAG	(+)	1-23	702	Varghese et al., 2006
	VP3R	GTAACATAGATTATTACGGGACC	(-)	677-702		
VP6	GEN_VP6F	GAC GGV GCR ACT ACA TGG T	(+)	1-20	1356	Iturriza-Gómara et al., 2002
	GEN_VP6R	GTC CAA TTC ATN CCT GGT GG	(-)	1340-1356		
NSP1	GEN_NSP1F	GGC TTT TTT TTA TGA AAA GTC TTG	(+)	1-23	1578	Matthijnsens, personal communication
	GEN_NSP1R	GGT CAC ATT TTA TGC TGC C	(-)	1560-1578		
NSP2	GEN_NSP2F	GGC TTT TAA AGC GTC TCA G	(+)	1-19	1057	Matthijnsens, personal communication
	GEN_NSP2R	GGT CAC ATA AGC GCT TTC	(-)	1041-1057		
NSP3	GEN_NSP3F	GGC TTT TAA TGC TTT TCA GTG	(+)	1-21	1077	Matthijnsens, personal communication
	GEN_NSP3R	ACA TAA CGC CCC TAT AGC	(-)	1056-1073		
NSP4	10BEG.16	TGTTCCGAGAGA GCGCGTG	(+)	16-34	725	Lee et al., 2000
	10END.722	GACCATTCCITCCATTAAC	(-)	740-722		
NSP5/NSP6	NSP5/NSP6F	GGCTTTAAAAGCGCATAGTGATGT	(+)	22-46	596	Mohan e Atreya, 2001
	NSP5/NSP6R	GGTCACAAAACGGGAGTGGGGGAG	(-)	618-594		

- **RT-PCR P consensual para o rotavírus grupo A**

– **Mix desnaturação**

Mix Desnaturação P tipo
con 2 (20 pmol) – 1 µL
con 3 (20 pmol) – 1 µL
Água 3 µL
Volume final – 5 µL

Mix Desnaturação G tipo
Beg 9 (20 pmol) – 1 µL
End 9 (20 pmol) – 1 µL
End 9 UK (20 pmol) – 1 µL
End 9 CRW8 (20 pmol) – 1 µL
Água 3 µL
Volume final – 5 µL

Mix Desnaturação VP1-VP3, VP6, NSP1-NSP5/6
F (20 pmol) – 1 µL
R (20 pmol) – 1 µL
Água 3 µL
Volume final – 5 µL

– **Mix Transcrição Reversa (RT-MIX)**

Mix RT-PCR
Tampão 10 x pH 8,4 - 2,5 µL
MgCl ₂ 50 mM - 2,5 µL
dNTP 2,5 mM - 4,0µL
<i>SuperScript HII</i> ® 200U/µL - 0,15µL
Água - 5,85 µL
Volume final - 15 µL

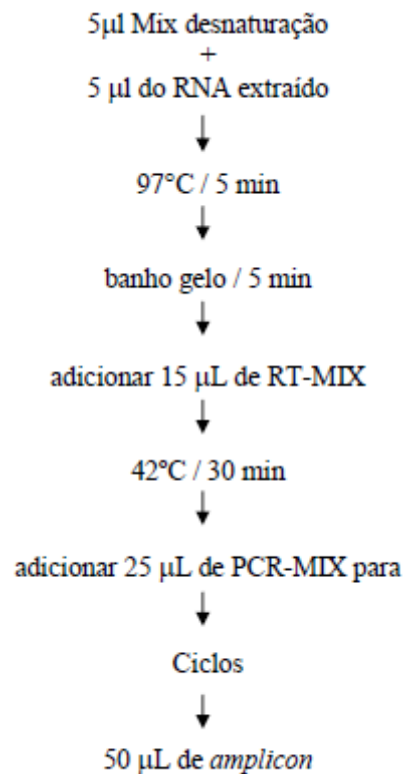
– **Mix Reação da Polimerase em Cadeia (PCR-MIX)**

Mix PCR P tipo (VP4)
Tampão 10 x pH 8,4 - 2,5 µL
dNTP 2,5 mM - 4µL
<i>Platinum®Taq DNA Polymerase</i> 5U/µL - 0,25 µL
Primer con 2 (20 pmol) - 1 µL
Primer con 3 (20 pmol) - 1 µL
Água - 16,25 µL
Volume final - 25 µL

Mix PCR G tipo (VP7)
Tampão 10 x pH 8,4 - 2,5 µL
dNTP 2,5 mM - 4µL
<i>Platinum®Taq DNA Polymerase</i> 5U/µL - 0,25 µL
Água - 18,25 µL
Volume final - 25 µL

Mix PCR VP1-VP3, VP6, NSP1-NSP5/6
Tampão 10 x pH 8,4 - 2,5 µL
dNTP 2,5 mM - 4µL
<i>Platinum®Taq DNA Polymerase</i> 5U/µL - 0,25 µL
F (20 pmol) - 1 µL
R (20 pmol) - 1 µL
Água - 16,25 µL
Volume final - 25 µL

Esquema da RT-PCR



Ciclos da PCR					
<i>Proteínas de RV-A</i>					
<i>Ciclos</i>	VP1, VP2, VP3, NSP1, NSP2, NSP3	VP4, VP7	VP6	NSP4	NSP5/6
<i>Desnaturação inicial</i>	94°C / 3 min	94°C / 3 min	94°C / 3 min	94°C / 3 min	94°C / 3 min
<i>Desnaturação</i>	94°C / 1 min	94°C / 45 s	94°C / 1 min	94°C / 45 s	94°C / 30 s
<i>Anelamento</i>	52°C / 1min	45°C / 45 s	52°C / 40 s	49°C / 30 s	42°C / 30 s
<i>Extensão</i>	72°C / 2 min	72°C / 1 min	72°C / 1 min	72°C / 1,5 min	72°C / 45 s
<i>x vezes</i>	(30x)	(40x)	(30x)	(30x)	(40x)
<i>Extensão final</i>	72°C/7 min	72°C / 10 min	72°C/10 min	72°C/10 min	72°C/10 min

- ***Multiplex-nested-PCR***

– **Mix desnaturação**

Mix Desnaturação P tipo animal
con 2 (20 pmol) - 1 µL
pNCDV P[1] (20 pmol) - 1 µL
pUK P[5] (20 pmol) - 1 µL
pGott P[6] (20 pmol) - 1 µL
pOSU P[7] (20 pmol) - 1 µL
pB223 P[11] (20 pmol) - 1 µL
Volume final - 6 µL

– **Mix desnaturação**

Mix Desnaturação P tipo humano
con 3 (20 pmol) - 1 µL
2T-1 P[4] (20 pmol) - 1 µL
3T-1 P[6] (20 pmol) - 1 µL
1T-1 P[8] (20 pmol) - 1 µL
4T-1 P[9] (20 pmol) - 1 µL
Volume final - 5µL

– **Mix desnaturação**

Mix Desnaturação G tipo animal
sBeg9 (20 pmol) - 1 µL
FT5 G5 (20 pmol) - 1 µL
DT6 G6 (20 pmol) - 1 µL
HT8 G8 (20 pmol) - 1 µL
ET10 G10 (20 pmol) - 1 µL
BT11 G11 (20 pmol) - 1 µL
Volume final - 6µL

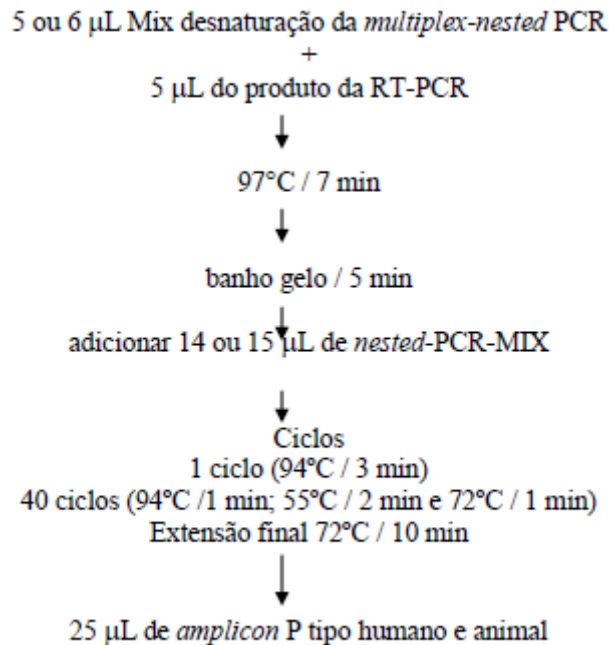
– **Mix desnaturação**

Mix Desnaturação G tipo humano
sBeg 9 (20 pmol) - 1 µL
9T1-1 G1 (20 pmol) - 1 µL
9T1-2 G2 (20 pmol) - 1 µL
9T-3P G3 (20 pmol) - 1 µL
9T-4 G4 (20 pmol) - 1 µL
9T-9B G9(20 pmol) - 1 µL
Volume final - 6 µL

– **Mix Reação da Multiplex-nested-PCR (nested PCR-MIX)**

Mix Multiplex-nested-PCR
Tampão 10 x pH 8,4 - 5 µL
MgCl ₂ 50 mM - 1 µL
dNTP 2,5 mM - 4,0µL
<i>Platinum®Taq DNA Polymerase</i> 5U/µL - 0,25 µL
Água - q.s.p. para 24 µL (P tipo animal) ou 25 µL (P tipo humano)
Volume final - 14µL (P e G tipo animal e G tipo humano) ou 15 µL (P tipo humano)

Esquema da *multiplex-nested-PCR* para P tipo humano e animal de RV-A



- **Eletroforese em gel de agarose 1%**

- 0,5 g de agarose
- 50 mL TEB *buffer* (Tris 89 mM; ácido bórico 89 mM; EDTA 2 mM) pH 8,4
- 20 μL de brometo de etídeo (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

São utilizados 8 μL do amplicon e 2 μL do tampão de amostra, onde a eletroforese sob voltagem (100V) e amperagem (80A) constantes, perdura por aproximadamente 60 min (RT-PCR) e 120 min (*multiplex-nested-PCR*).

- **Eletroforese em gel de agarose 2%**

- 1 g de agarose
- 50 mL TEB *buffer* (Tris 89 mM; ácido bórico 89 mM; EDTA 2 mM) pH 8,4
- 20 μL de brometo de etídeo (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

São utilizados 8 μL do amplicon e 2 μL do tampão de amostra, onde a eletroforese sob voltagem (100V) e amperagem (80A) constantes, perdura por aproximadamente 60 min (RT-PCR) e 120 min (*multiplex-nested-PCR*).

- **Purificação de produto de PCR excisado do gel**

1. Pesar o fragmento excisado do gel em microtubo de 1,5 mL.
2. Adicionar 10 uL do *Capture buffer type 2* para cada 10 mg de gel.
3. Incubar o tubo a 60°C / 15 min, homogeneizando a cada 3 min.
4. Centrifugar a 13.000 x g/30s
5. Transferir 600 uL da amostra com o *Capture buffer type 2* em um tubo coletor com coluna
6. Incubar em temperatura ambiente por 1 min
7. Centrifugar a 13.000 x g/30s
8. Descartar o filtrado e recolocar a coluna no mesmo tubo.
9. Adicionar 500 uL do *Wash buffer type 1* na coluna com tubo coletor
10. Centrifugar a 13.000 x g/30s
11. Descartar o filtrado e transferir a coluna para um microtubo de 1,5 mL.
12. Adicionar 30 uL do *Elution buffer type 6*
13. Incubar a temperatura ambiente por 1 min.
14. Centrifugar a 13.000 x g/1 min.
15. Estocar o DNA purificado em -20°C.

- **Quantificação de produto de PCR**

1. Preparar a solução *Quant-iT™ Working Solution* diluindo o reagente *Quant-iT™* no *Buffer Quant-iT™*, 1:200. São necessários 200 uL desta solução por amostra e para os padrões 0 e 100.
2. Homogeneizar em vórtex.
3. No microtubo das amostras adicionar 198 uL da solução *Quant-iT™ Working Solution* a 2 uL do DNA purificado.
4. No microtubo do padrão 0 adicionar 190 uL da solução *Quant-iT™ Working Solution* a 10 uL do padrão 0.
5. No microtubo do padrão 100 adicionar 190 uL da solução *Quant-iT™ Working Solution* a 10 uL do padrão 100.
6. Homogeneizar os microtubos em vórtex por 2-3 s
7. Incubar os microtubos em temperatura ambiente por 2 min
8. Realizar a leitura usando *Qubit™ fluorometer (Invitrogen™ Life Technologies, EUA)*
9. Multiplicar pelo fator de diluição para determinar a concentração correta da amostra

- **Isolamento viral em cultivo celular**

Tripsinização de monocamadas

1. Em fluxo laminar, desprezar o sobrenadante da garrafa contendo o tapete de cultura celular MA-104.
2. Lavar duas vezes com 2 mL de solução salina pré-aquecida em estufa e desprezar a salina.
3. Adicionar 2 mL de tripsina verseno e lavar a garrafa.
4. Colocar mais 2 mL de tripsina verseno, lavar o tapete e desprezar uma parte da tripsina.
5. Fechar a garrafa e colocar alguns minutos na estufa a 37°C com o tapete em contato com a tripsina (garrafa deitada).
6. Bater na garrafa para soltar o tapete.
7. Colocar 5 mL de meio MEM Dulbecco's de repique com soro fetal bovino.
8. Homogeneizar bem com a pipeta.
9. Colocar mais 5 mL de MEM Dulbecco's de repique.
10. Homogeneizar bem e passar 5 mL para outra garrafa.
11. Colocar na estufa (37°C) e observar diariamente o fechamento do tapete.
12. Após estar fechado repicar novamente a garrafa.

Montagem de tubos com MA-104 para isolamento

1. Em fluxo laminar, desprezar o sobrenadante da garrafa contendo o tapete de cultura celular MA-104
2. Lavar duas vezes com 2 mL de solução salina pré-aquecida em estufa e desprezar a salina.
3. Adicionar 2 mL de tripsina verseno e lavar a garrafa.
4. Colocar mais 2 mL de tripsina verseno, lavar o tapete e desprezar uma parte da tripsina.
5. Fechar a garrafa e colocar alguns minutos na estufa a 37°C com o tapete em contato com a tripsina (garrafa deitada).
6. Bater na garrafa para soltar o tapete.
7. Colocar 5 mL de meio MEM Dulbecco's de repique com soro fetal bovino.
8. Homogeneizer bem com a pipeta.
9. Colocar mais 5 mL de MEM Dulbecco's de repique.
10. Homogeneizar bem e passar 1,5 mL para cada tubo com rosca.

11. Colocar na estufa (37°C), marcando o lado contrário do tubo para delimitar o lado do tapete.
12. Após 24h, observar o fechamento do tapete e inocular com suspensão fecal.

Inoculação de suspensão fecal em cultivo celular

1. Primeiramente, será preparada uma suspensão fecal a 20% (p/v) em meio de cultura *Dulbecco* (200 uL de fezes previamente positivas e 800 uL de meio de cultura puro).
2. Centrifugar a 2.500 g/15 min a 4°C.
3. 50 uL do sobrenadante são recolhidos e adicionados a 450 uL de MEM *Dulbecco* puro em outro microtubo.
4. Tratar com 100 ug/mL de gentamicina (usa-se 5 uL de gentamicina na apresentação de 40 mg/mL) e 2,5 ug/mL de anfotericina B (usa-se 40 uL de anfotericina B na apresentação de 250 ug/mL).
5. Armazenar por no mínimo 24 h a 4° C.
6. 50 uL da suspensão é adicionada a 450 uL de MEM *Dulbecco's* para ficar na diluição 1:100 (1:10 e 1:10).
7. A suspensão é tratada com tripsina (10 uL) na concentração de 20 ug/mL por 30 min a 37° C.
8. Inocular em tubos com uma monocamada de células MA-104.
9. Após adsorção por 1h em *roller*, as suspensões serão retiradas.
10. Os tubos são lavados com MEM *Dulbecco's* puro duas vezes, e colocado 1,5 mL de meio de cultura de manutenção e 0,5 ug/mL de tripsina.
11. Os tubos são mantidos em estufa a 37° C, avaliados diariamente para a observação de efeito citopático, e mantidos por até uma semana.
12. Antes do descarte os tubos serão colocados em geladeira a 4°C.
13. Antes da próxima passagem, os tubos são congelados e descongelados três vezes.
14. Na próxima inoculação, os 500 uL do sobrenadante puro são tratados novamente com tripsina por 30 min a 37°C e seguindo o mesmo processo da primeira passagem.

Congelamento de células

1. Tripsinizar as células como rotina.
2. Colocar meio *Dulbecco* de repique e transferir para um tubo de centrífuga

3. Centrifugar em baixa rotação por 2 a 3 minutos
4. Retirar o sobrenadante delicadamente
5. Adicionar meio de congelamento sempre com movimento no tubo de centrífuga para homogeneizar bem e ressuspender o *pellet*
6. Calcular o volume de 0,5 - 1,0 mL para tubo *nunc*
7. Pode-se providenciar a contagem de células na câmara de *newbauer*
8. Logo que os tubos vão sendo completados com 0,5 ou 1,0 mL, colocá-los em caixa de isopor com gelo moído e transferir rapidamente para freezer -70°C *over night*
9. Transferir para nitrogênio líquido

Descongelamento de células

1. Retirar o tubo *nunc* do nitrogênio líquido
2. Transferir para banho-maria a 37°C
3. Transferir para o banho de gelo para resfriamento durante 3 min logo após descongelar
4. Retirar tubo do banho de gelo e deixá-lo em repouso, em temperatura ambiente por 10 min
5. Centrifugar a suspensão celular a $1500\times g$ por 10 min
6. Decantar o sobrenadante, ressuspender o sedimento celular em 5,0 mL de meio (para garrafas pequenas). Nesta etapa pode-se colocar o conteúdo do *nunc* em um tubo de centrífuga e adicionar gota a gota 10 mL de meio.

ANEXO C
Soluções e Tampões

• **Diluição dos *primers***

Para PCR VP1

- *Primer VP1 forward*

Concentração: 14,68 nmol

Data de fabricação: Out.2011

$$14,68 \times 1000 = 14680 \text{ pmol}$$

$$14680 / 200 = 73,4 \text{ água ultra-pura}$$

- *Primer VP1 reverse*

Concentração: 15,96 nmol

Data de fabricação: Out.2011

$$15,96 \times 1000 = 15960 \text{ pmol}$$

$$15960 / 200 = 79,8 \text{ água ultra-pura}$$

Para PCR VP2

- *Primer VP2 forward*

Concentração: 20,28 nmol

Data de fabricação: Out.2011

$$20,28 \times 1000 = 20280 \text{ pmol}$$

$$20280 / 200 = 101,4 \text{ água ultra-pura}$$

- *Primer VP2 reverse*

Concentração: 18,79 nmol

Data de fabricação: Out.2011

$$18,79 \times 1000 = 18790 \text{ pmol}$$

$$18790 / 200 = 93,95 \text{ água ultra-pura}$$

Para PCR VP3

- *Primer VP3 forward*

Concentração: 16,66 nmol

Data de fabricação: Out.2011

$$16,66 \times 1000 = 16660 \text{ pmol}$$

$$16660 / 200 = 83,3 \text{ água ultra-pura}$$

- *Primer VP3 reverse*

Concentração: 15,99 nmol

Data de fabricação: Out.2011

$$15,99 \times 1000 = 15990 \text{ pmol}$$

$$15990 / 200 = 79,95 \text{ água ultra-pura}$$

Para PCR P (VP4) consensual

- *Primer Con 3M forward*

Concentração: 20,46 nmol

Data de fabricação: Jul.2009

$$20,46 \times 1000 = 20460 \text{ pmol}$$

$$20460 / 200 = 102,3 \text{ água ultra-pura}$$

- *Primer Con 2 reverse*

Concentração: 27,42 nmol

Data de fabricação: Dez.2008

$$27,42 \times 1000 = 27420 \text{ pmol}$$

$$27420 / 200 = 137,10 \text{ água ultra-pura}$$

Para PCR VP6

- *Primer VP6 forward*

Concentração: 20,84 nmol

Data de fabricação: Out.2010

$$20,84 \times 1000 = 20840 \text{ pmol}$$

$$20840 / 200 = 104,2 \text{ água ultra-pura}$$

- *Primer VP6 reverse*

Concentração: 22,31 nmol

Data de fabricação: Out.2010

$$22,31 \times 1000 = 22310 \text{ pmol}$$

$$22310 / 200 = 111,55 \text{ água ultra-pura}$$

Para PCR G (VP7) consensual

- *Primer Beg9 forward*

Concentração: 19,28 nmol

Data de fabricação: Set.2008

$$19,28 \times 100 = 19280 \text{ pmol}$$

$$19280 / 200 = 96,4 \text{ água ultra-pura}$$

- *Primer End 9 reverse*

Concentração: 22,52 nmol

Data de fabricação: Set.2008

$$22,52 \times 1000 = 22520 \text{ pmol}$$

$$22520 / 200 = 112,6 \text{ água ultra-pura}$$

- *Primer End 9 (UK) reverse*

Concentração: 23,38 nmol

Data de fabricação: Set.2008

$$23,38 \times 1000 = 23380 \text{ pmol}$$

$$23380 / 200 = 116,9 \text{ água ultra-pura}$$

- *Primer End 9 (CRW8) reverse*

Concentração: 22,87 nmol

Data de fabricação: Set.2008

$$22,87 \times 1000 = 22870 \text{ pmol}$$

$$22870 / 200 = 114,35 \text{ água ultra-pura}$$

Para PCR NSP1

- *Primer NSP1 forward*

Concentração: 18,9 nmol

Data de fabricação: Out.2010

$$18,9 \times 1000 = 18900 \text{ pmol}$$

$$18900 / 200 = 94,5 \text{ água ultra-pura}$$

- *Primer NSP1 reverse*

Concentração: 19,75 nmol

Data de fabricação: Out.2010

$$19,75 \times 1000 = 19750 \text{ pmol}$$

$$19750 / 200 = 98,75 \text{ água ultra-pura}$$

Para PCR NSP2

- *Primer NSP2 forward*

Concentração: 22,54 nmol

Data de fabricação: Out.2010

$$22,54 \times 1000 = 22740 \text{ pmol}$$

$$22740 / 200 = 112,7 \text{ água ultra-pura}$$

- *Primer NSP2 reverse*

Concentração: 21,89 nmol

Data de fabricação: Out.2010

$$21,89 \times 1000 = 21890 \text{ pmol}$$

$$21890 / 200 = 109,45 \text{ água ultra-pura}$$

Para PCR NSP3

- *Primer NSP3 forward*

Concentração: 21,4 nmol

Data de fabricação: Out.2010

$$21,4 \times 1000 = 21400 \text{ pmol}$$

$$21400 / 200 = 107 \text{ água ultra-pura}$$

- *Primer NSP3 reverse*

Concentração: 36,22 nmol

Data de fabricação: Out.2010

$$36,22 \times 1000 = 36220 \text{ pmol}$$

$$36220 / 200 = 181,1 \text{ água ultra-pura}$$

Para PCR NSP4

- *Primer 10.Beg.16 forward*

Concentração: 20,1 nmol

Data de fabricação: Out.2010

$$20,1 \times 1000 = 20100 \text{ pmol}$$

$$20100 / 200 = 100,5 \text{ água ultra-pura}$$

- *Primer 10.End.722 reverse*

Concentração: 20,86 nmol

Data de fabricação: Out.2010

$$20,86 \times 1000 = 20860 \text{ pmol}$$

$$20860 / 200 = 104,3 \text{ água ultra-pura}$$

Para PCR NSP5/6

- *Primer NSP5/6 forward*

Concentração: 20,75 nmol

Data de fabricação: Out.2010

$$20,75 \times 1000 = 20750 \text{ pmol}$$

$$20750 / 200 = 103,75 \text{ água ultra-pura}$$

- *Primer NSP5/6 reverse*

Concentração: 19,94 nmol

Data de fabricação: Out.2010

$$19,94 \times 1000 = 19940 \text{ pmol}$$

$$19940 / 200 = 99,7 \text{ água ultra-pura}$$

Solução estoque: ressuspender em água ultra-pura autoclavada para obtenção de solução 10x []

Solução de uso de todos os primers: diluir 1:10 a solução estoque em água ultra-pura. Concentração final: 20 pmol/ul

• **Diluição de dNTP**

- solução estoque - concentração 100 mM - 25 mM de cada dNTP
- solução uso - concentração 10 mM - 2.5 mM de cada dNTP - 10 **ul** da solução estoque + 90 **ul** de água ultra-pura autoclavada

• **Fenol / clorofórmio - álcool isoamílico (25:24:1)**

- 24 mL fenol saturado
- 24 mL clorofórmio
- 1 mL álcool isoamílico

- **Gel de agarose 2%**

- 1 g agarose
- 50 mL de tampão TBE 1x
- 20 uL de brometo de etídeo

- **Gel inferior (7,5%) do PAGE**

- 5 mL *Lower* TRIS
- 3 mL acrilamida/Bisacrilamida
- 50 uL TEMED
- 0,56 mL persulfato de amônio 2%
- 11,44 mL água bidestilada

- **Gel superior (3,5%) do PAGE**

- 2,5 mL *Upper* TRIS
- 0,7 mL acrilamida/bisacrilamida
- 50 uL TEMED
- 0,60 mL persulfato de amônio 2%
- 6,20 mL água bidestilada

- **Hidratação da sílica**

- 60 g de sílica (SIGMA®)
- Adicionar 500 mL de água ultra-pura autoclavada
- Agitar lentamente e manter em repouso durante 24 h
- Por sucção, desprezar 430 mL do sobrenadante
- Ressuspender a sílica em 500 mL de água bidestilada
- Manter em repouso durante 5 h para sedimentar
- Desprezar 440 mL do sobrenadante
- Ajustar o pH (pH 2,0)
- Aliquotar e autoclavar

- **Lower TRIS pH 8,8 para PAGE**

- 36,34 g TRIS (1,5M)
- água bidestilada q.s.p. 200 mL

- **SDS 10%**

- 5 g dodecil sulfato de sódio - Lauril sulfato de sódio - SDS ($C_{12}H_{25}NaO_4S$)
- água bidestilada q.s.p. 50 mL

- **Solução L6**

- 120 g de isotiocianato de guanidina (GUSCN)
- 100 mL de TRIS-HCl 0,1 M pH 6,4
- 22 mL de EDTA 0,2 M pH 8,0
- 2,6 g de Triton 100
- água bidestilada q.s.p. 1 litro

- **Solução L2**

- 120 g de isotiocianato de guanidina (GUSCN)
- 100 mL de TRIS-HCl 0,1 M pH 6,4
- água bidestilada q.s.p. 1 litro

- **Solução Acrilamida / Bisacrilamida**

- 1,3 g bisacrilamida
- 50 g acrilamida
- água bidestilada q.s.p. 100 mL

- **Solução conservadora para PAGE**

- 15 mL álcool etílico P.A.
- água bidestilada q.s.p. 300 mL

- **Solução de prata para PAGE**

- 0,55 g de nitrato de prata
- água bidestilada q.s.p. 300 mL

- **Solução fixadora para PAGE**

- 30 mL álcool etílico absoluto
- 1,5 mL ácido acético
- água bidestilada q.s.p. 300 mL

- **Solução reveladora para PAGE**

- 9 g hidróxido de sódio
- 2,5 mL formaldeído
- 0,06 g borohidreto de sódio
- água bidestilada q.s.p. 300 mL

- **Solução *stop* da coloração para PAGE**

- 15 mL ácido acético P.A.
- água bidestilada q.s.p. 300 mL

- **Tampão de amostra para eletroforese em gel de agarose**

- 0,25 g azul de bromofenol 0,25%
- 45 g sacarose - sucrose ($C_{12}H_{22}O_{11}$) 45%
- água bidestilada q.s.p. 100 mL

- **Tampão de amostra para eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE)**

- 0,2 mL azul de bromofenol 1%
- 6,0 mL SDS 10%
- 1 mL 2-mercaptoetanol
- 2,5 mL TRIS-HCl 0,5M
- 6 g uréia
- água bidestilada q.s.p. 20 mL

- **Tampão de corrida - TBE (Tris - Ácido bórico - EDTA) 10x[]**

- 107,78 g Tris 0,89 M
- 55,03 g ácido bórico 0,89 M
- 7,45 g EDTA 0,02 M
- água bidestilada q.s.p. 1 litro
- pH 8,4

- **Tampão de corrida para PAGE**

- 30 g TRIS 0,24M
- 14,4 g ácido aminoacético (glicina) (NH₂CH₂COOH) 0,19M
- água bidestilada q.s.p. 1 litro

- **Tampão de estabilização para o rotavírus (TRIS/Ca⁺⁺) 10 x - pH 7,2**

- 12,12 g TRIS (0,89mM)
- 2,2 g cloreto de cálcio (1,5mM)
- Água ultra-pura autoclavada q.s.p. 1L

- ***Upper* TRIS pH 6,8 para PAGE**

- 12,12 g TRIS (0,5M)
- água bidestilada q.s.p. 200 mL

Soluções para cultura de célula

- **Bicarbonato de sódio 1,4% (1x)**

- 2,8 g de NaHCO₃
- Água bidestilada q.s.p 200 mL
- Agitar
- Distribuir em tubo de rosca
- Esterilizar em autoclave por 15 min
- Armazenar a 4°C

- **Meio de congelamento de células**

- Soro fetal bovino 90%
- DMSO 10%
- Utilizar gelado

- **Meio de cultura celular**

- 1 frasco de meio de cultura Dulbecco
- 2,5 g de bicarbonato de sódio (NaHCO₃)
- Água bidestilada q.s.p 1000 mL
- Prova de esterilidade em meio BHI
- Antes de filtrar o meio borbulhá-lo com CO₂ até pH 6,8
- Filtrar em filtro de 0,22 um
- Manter em geladeira

- **Meio de manutenção de células**

- 100 mL de meio de cultura Dulbecco
- 100 uL de gentamicina (40 mg/mL) ou 20 uL de enrofloxacino (2,5%)
- 1 mL de fungizona (250 ug/mL)
- 10 mL de Hepes

- **Meio de repique de células**

- 100 mL de meio de cultura Dulbecco
- 100 uL de gentamicina (40 mg/mL) ou 20 uL de enrofloxacino (2,5%)
- 1 mL de fungizona (250 ug/mL)
- 10 mL de Hepes
- 2,5 mL de soro fetal bovino

- **Solução L-glutamina (200 mM)**

- 2,92 g de L-glutamina
- Água bidestilada q.s.p 100 mL
- Filtrar em filtro de 0,22 um
- Distribuir em pequenas alíquotas de 1,0 mL em tubos de rosca
- Armazenar congelada em - 20°C por 1 mês
- Descongelar antes do uso em banho-maria 37°C

- **Solução salina de StT Groth**

- 8,0 g de NaCl
- 0,4 g de KCl
- 1,72 g de Na₂HPO₄ 2H₂O
- 0,69 g de NH₂PO₄ H₂O
- 2,0 g de glicose
- 0,2 mL de solução vermelho de fenol 1 %
- Dissolver os reagentes acima em 800 mL de água bidestilada
- Acerte o pH para 7,2 com NaOH ou HCl 0,1N
- Complete o volume para 1000 mL com água bidestilada
- Esterilizar em autoclave a 115°C por 15 min
- Armazenar em geladeira

- **Solução stock de tripsina (Difco 1:250)**

- 0,1 g de tripsina
- 100 mL de água DEPEC
- Deixar homogeneizar 30 min em temperatura ambiente com parte da água
- Completa para o restante da água DEPEC
- Clarificar em *seitz* (pré-lavado com 300 mL de água bidestilada)
- Esterilizar em milipore com pré-filtro e filtro 0,22 μ m
- Distribuir em alíquotas de 1,0 mL
- Armazenar a -20°C
- O restante de cada alíquota descongelada deve ser desprezado

- **Soro fetal bovino**

- Clarificar *seitz* (pré-lavado com 200 mL de água destilada)
- Esterilizar por filtração em filtro 0,22 μ m (pré-filtro 1,42 μ m ou 0,45 μ m)
- Distribuir em tubos de rosca com 10 mL e congelar a -20°C

- **Tripsina Verseno (0,05%)**

- 8,0 g de NaCl
- 0,4 g de KCl
- 1,0 g de glicose 1.H₂O (Dextrose)
- 0,58 g de NaHCO₃
- 0,2 g de Verseno (EDTA)
- 0,5 g de tripsina (1:250)
- 0,45 g de vermelho de fenol 1%
- água bidestilada q.s.p 1000 mL
- Agitar por 1h
- Ajustar pH com NaOH ou HCl 1N para 7,8
- Filtrar em membrana 0,22 μ m
- Estocar a -20°C em alíquotas de 50 mL
- Após descongelar, guardar o que sobrou em geladeira.

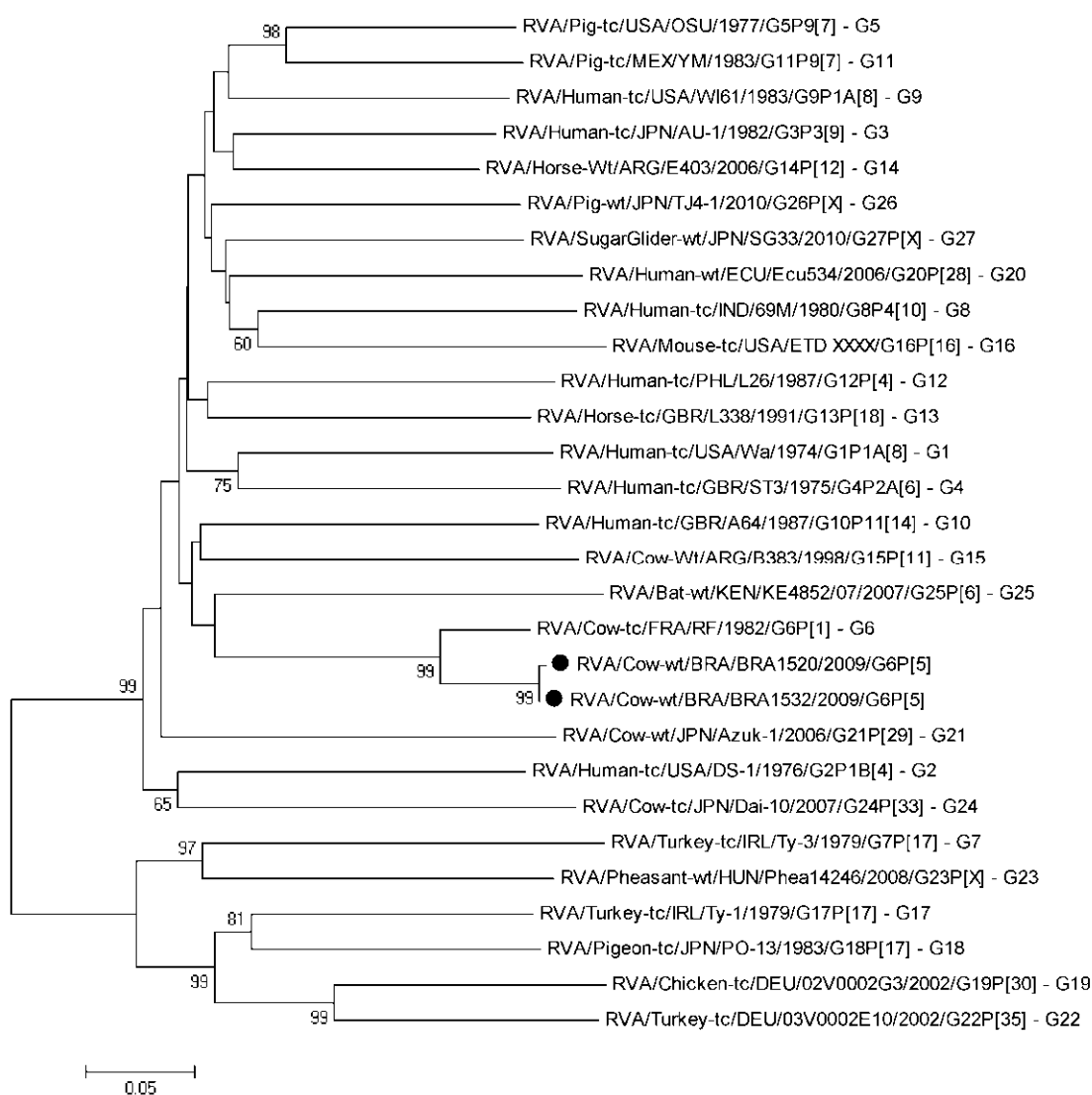
ANEXO DLista de *Software*

- Electropherogram quality analysis - Phred e CAP3
(<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>)
- BLAST The Basic Local Alignment Search Tool
(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)
- MEGA package software version 5.05
(<http://www.megasoftware.net/mega5/mega5.html>)
- BioEdit software version 7.0.9.0
(<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>)

APÊNDICES

APÊNDICE A

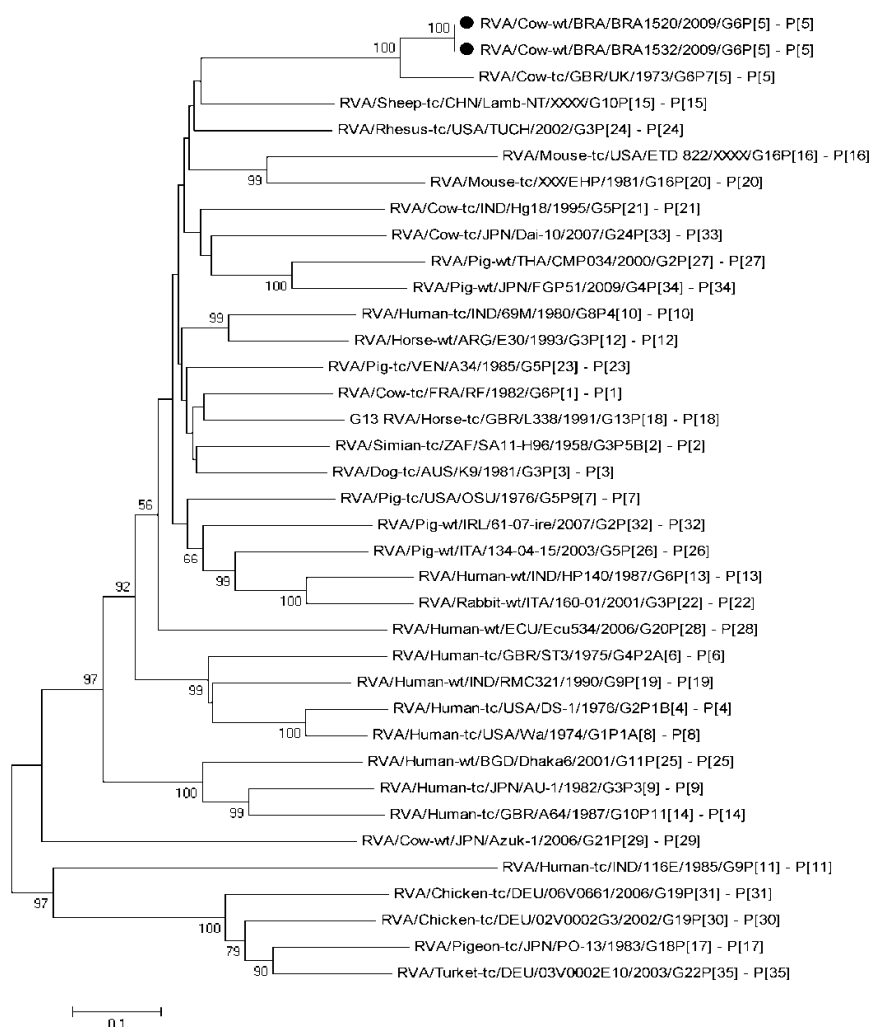
Árvore filogenética baseada na sequência parcial com 960 nt (63-1022 nt) da proteína VP7 de RV-A pertencentes aos genótipos G descritos. Números de acesso no *GenBank*: Wa (K02033), DS-1 (AB118023), AU-1 (D86271), ST3(X13603), OSU (X04613), RF (X65940), Ty-3 (AB080737), 69M (EF672560), WI61 (AB180969), A64 (EF672567), YM (M23194), L26 (M58290), L338 (JF712560), E403 (JF712582), B383 (FJ347116), ETDXXXX (GQ479955), Ty-1 (S58166), PO-13 (D82979), 02V0002G3 (FJ169861), Ecu534 (EU805775), AzuK-1 (AB454421), 03V0002E10 (EU486973), Phea14246 (FN393054), Dai-10 (AB513837), KE4852/07 (GU983676), TJ4-1 (AB605258), SG33 (AB621363), BRA1520/09, BRA1532/09. Os números adjacentes à árvore representam a porcentagem de bootstraps (de 1000 replicações). Valores de bootstrap abaixo de 50% foram omitidos.



APÊNDICE B

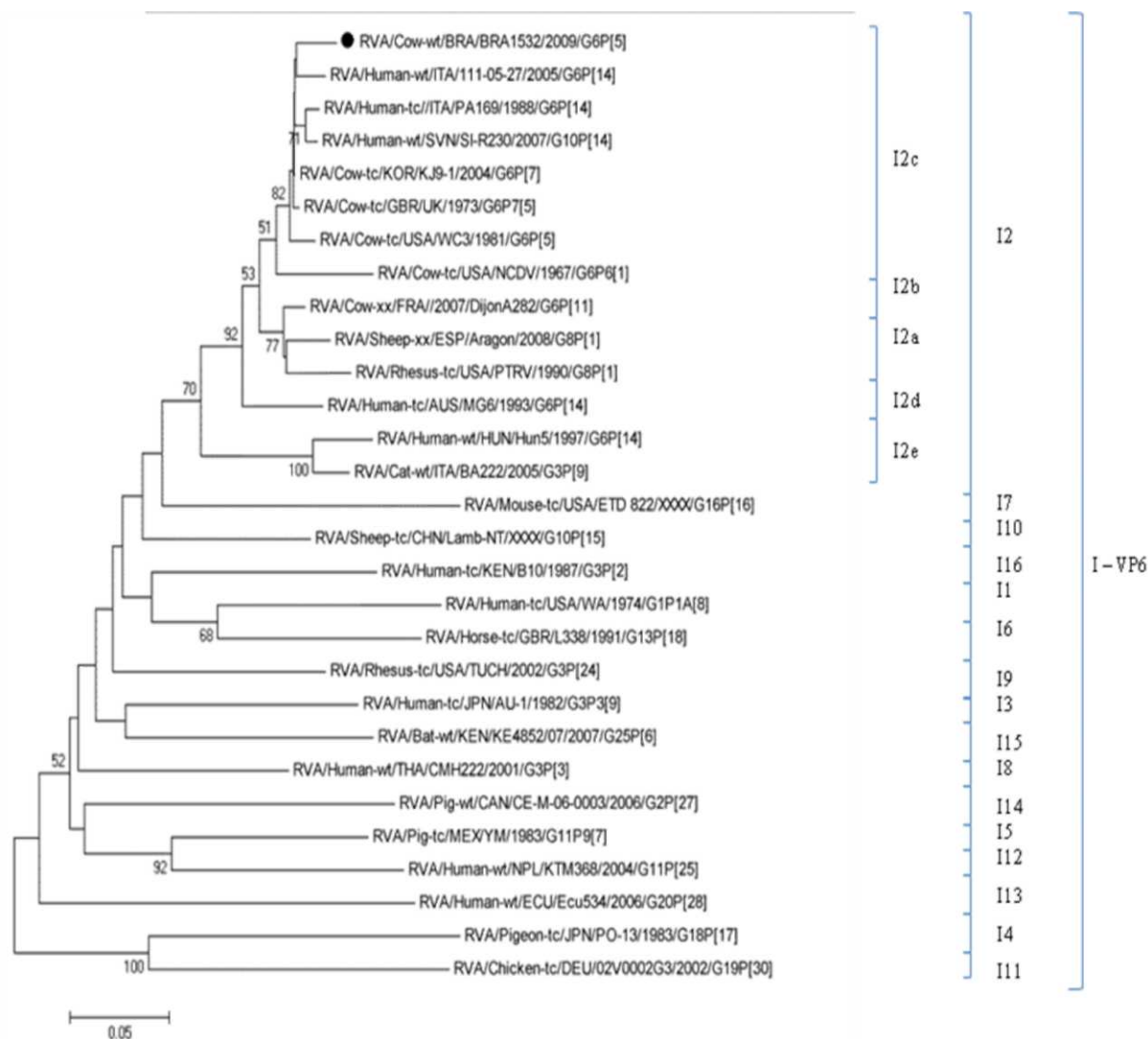
Árvore filogenética baseada na sequência parcial com 721 nt (47-767 nt) da proteína VP4 de RV-A pertencentes aos genótipos P descritos. Números de acesso no **GenBank**: RF (U65924), SA11-H96 (DQ841262), K9 (D14725), DS-1 (AJ540227), UK (M22306), ST3 (L33895), OSU (X13190), Wa (L34161), AU-1 (D10970), 69M (M60600), 116E (L07934), E30 (JF712569), HP140 (DQ003291), A64 (EF672563), Lamb-NT (FJ031027), ETD822 (GQ479950), PO-13 (AB009632), L338 (JF712558), RMC321 (AF523677), EHP (U08424), Hg18 (AF237665), 160-01 (AF526374), A34 (AY174094), TUCH (AY596189), Dhaka6 (GU199520), 134-04-15 (DQ061053), CMP034 (DQ534016), Ecu534 (EU805773), Azuk-1 (AB454420), 02V0002G3 (EU486956), 06V0661 (EU486962), 61-07-ire (FJ492835), Dai-10 (AB513836), FGP51 (AB571047), 03V0002E10 (EU486958), BRA1520/09, BRA1532/09.

Os números adjacentes à árvore representam a porcentagem de bootstraps (de 1000 replicações). Valores de bootstraps abaixo de 50% foram omitidos.



APÊNDICE C

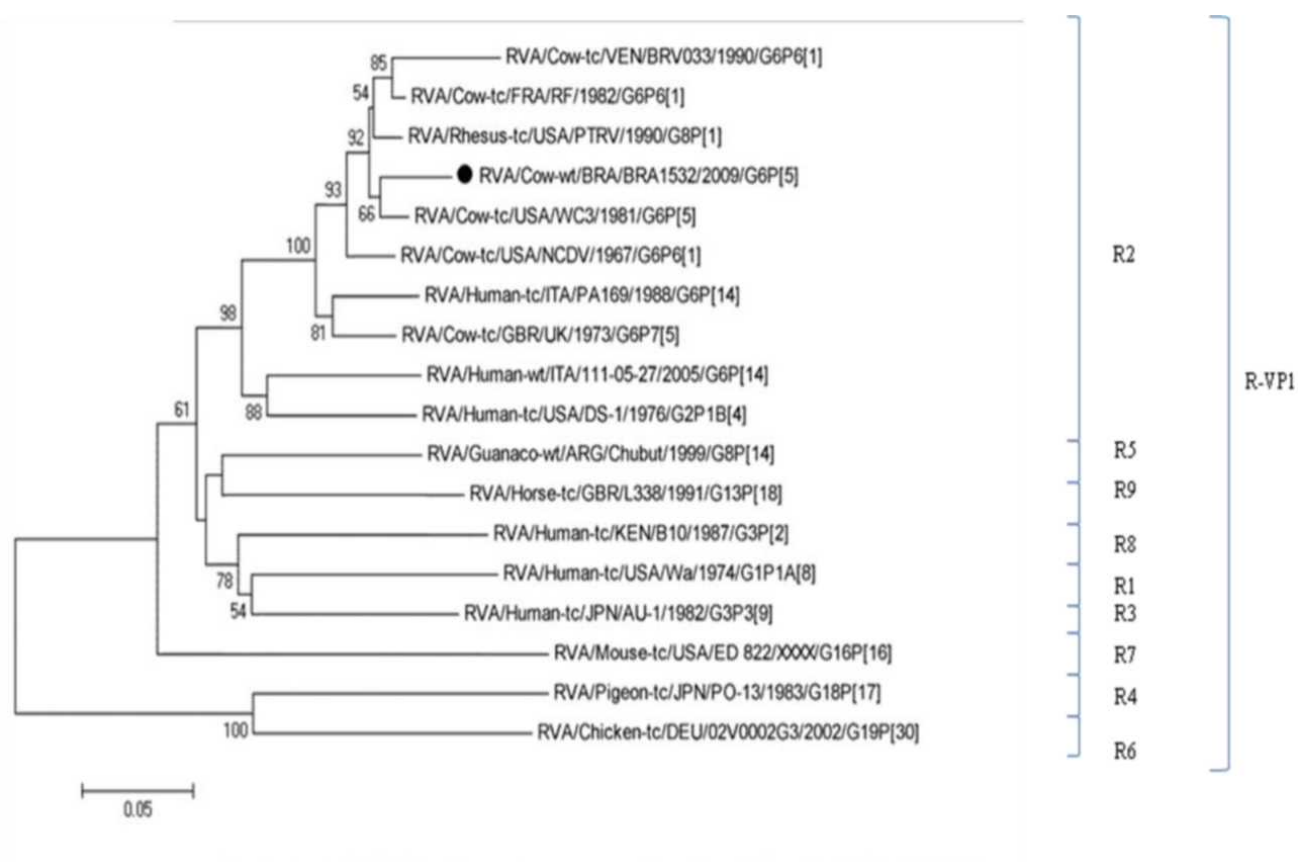
Árvore filogenética baseada na sequência parcial com 325 nt (784-1008 nt) da proteína VP6 de RV-A pertencentes aos genótipos I descritos. Números de acesso no *GenBank*: Wa (K02086), Aragon (FN675938), DijonA282 (GU259607), PTRV (FJ422136), WC3 (AF411322), PA169 (EF554130), MG6 (EF554097), NCDV (AF317127), UK (X53667), SI-R230 (GU584061), 111-05-27 (EF554141), KJ9-1 (HM988974), BA222 (GU827410), Hun5 (EF554108), DS-1 (DQ870507), AU-1 (DQ490538), PO-13 (D16329), YM (X69487), L338 (JF712559), ETD_822 (GQ479952), CMH222 (DQ288659), TUCH (AY594670), Lamb-NT (FJ031028), 02V0002G3 (DQ096805), KTM368 (GU199496), Ecu534 (EU805774), CE-M-06-0003 (GU183245), KE4852 (GU983675), B10 (HM627557), BRA1532/09. Os números adjacentes à árvore representam a porcentagem de bootstraps (de 1000 replicações). Valores de bootstraps abaixo de 50% foram omitidos.



APÊNDICE D

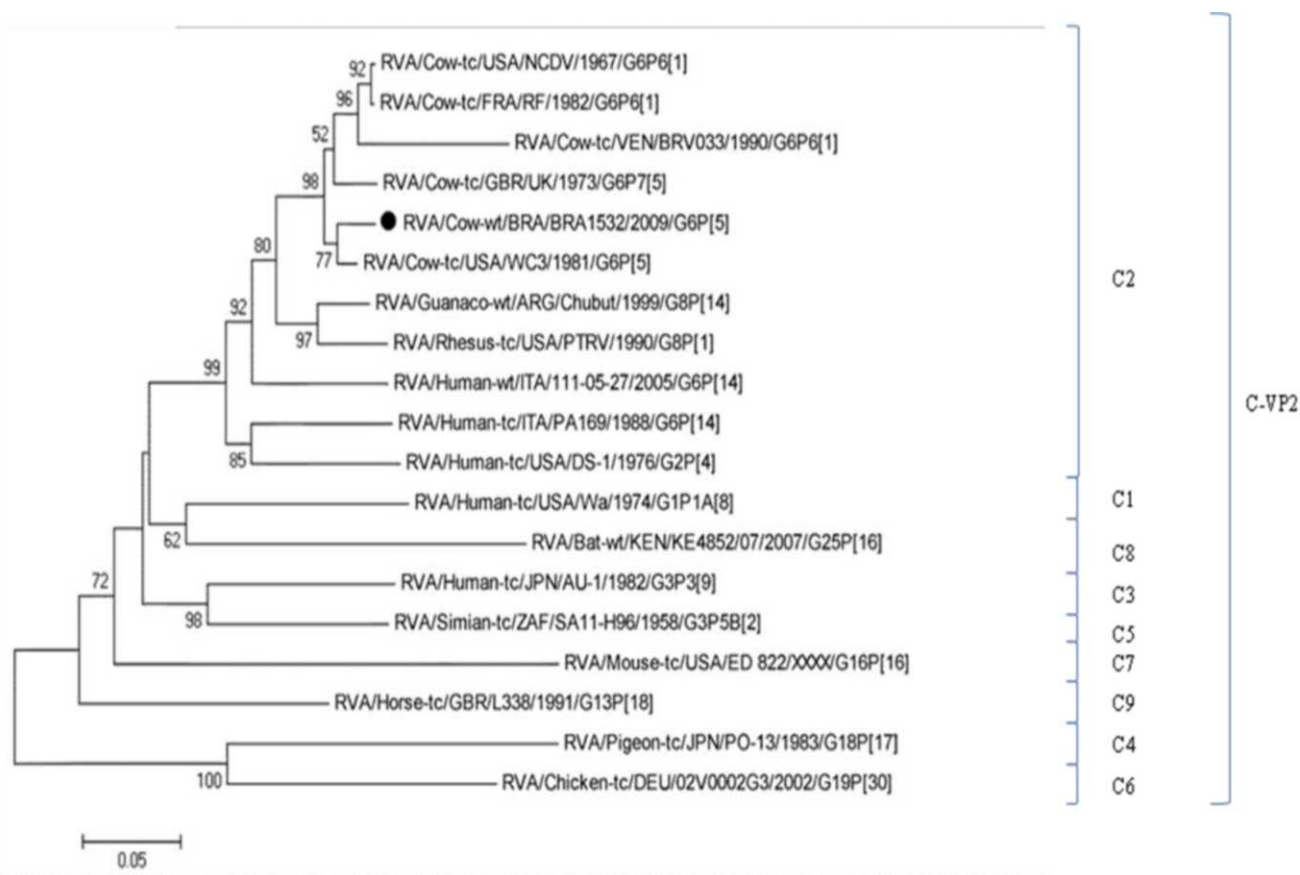
Árvore filogenética baseada na sequência parcial com 666 nt (16-682 nt) da proteína VP1 de RV-A pertencentes aos genótipos R descritos. Números de acesso no *GenBank*: Wa (DQ490539), DS-1 (DQ870505), PTRV (FJ422131), PA169 (EF554126), 111-05-27 (EF554137), NCDV (DQ870493), BRV033 (EF560612), RF (J04346), UK (X55444), WC3 (EF560615), AU-1 (DQ490533), PO-13, (AB009629), Chubut (FJ347100), 02V0002G3 (FJ169853), ED_822 (GQ479947), B10 (HM627553), L338 (JF712555), BRA1532/09. Os números adjacentes à árvore representam a porcentagem de bootstraps (de 1000 replicações).

Valores de bootstraps abaixo de 50% foram omitidos.



APÊNDICE E

Árvore filogenética baseada na sequência parcial com 677 nt (44-720 nt) da proteína VP2 de RV-A pertencentes aos genótipos C descritos. Números de acesso no *GenBank*: Wa (X14942), DS-1 (DQ870506), AU-1 (DQ490536), PO-13, (AB009630), SA11-H96 (DQ838635), 02V0002G3 (FJ169854), ED_822 (GQ479948), KE4852 (GU983673), L338 (JF712556), NCDV (DQ870494), BRV033 (EF560613), RF (X14057), UK (X52589), WC3 (EF560616), Chubut (FJ347101), PA169 (EF554127), 111-05-27 (EF554138), PTRV (FJ422132), BRA1532/09. Os números adjacentes à árvore representam a porcentagem de bootstraps (de 1000 replicações). Valores de bootstraps abaixo de 50% foram omitidos.

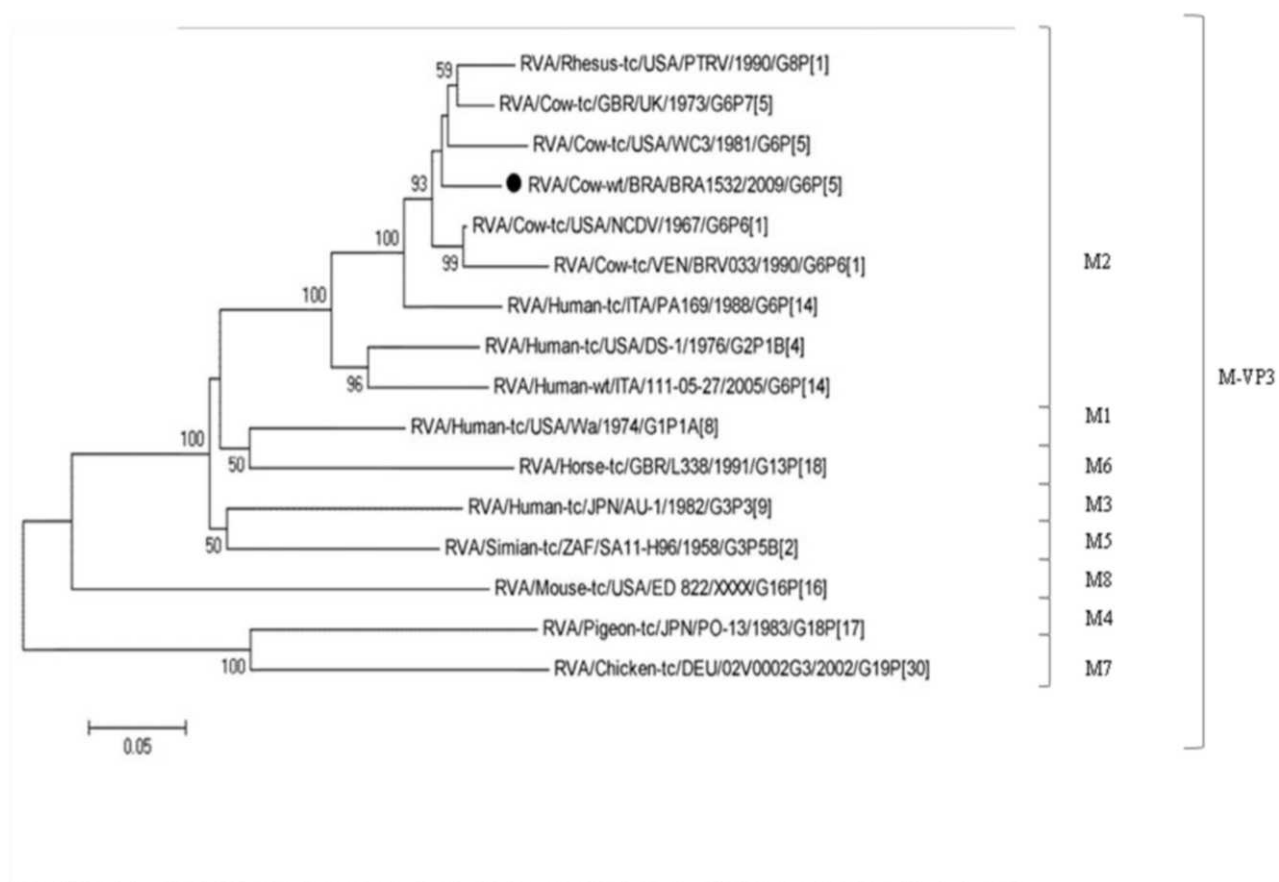


APÊNDICE F

Árvore filogenética baseada na sequência parcial com 568nt (70-637 nt) da proteína VP3 de

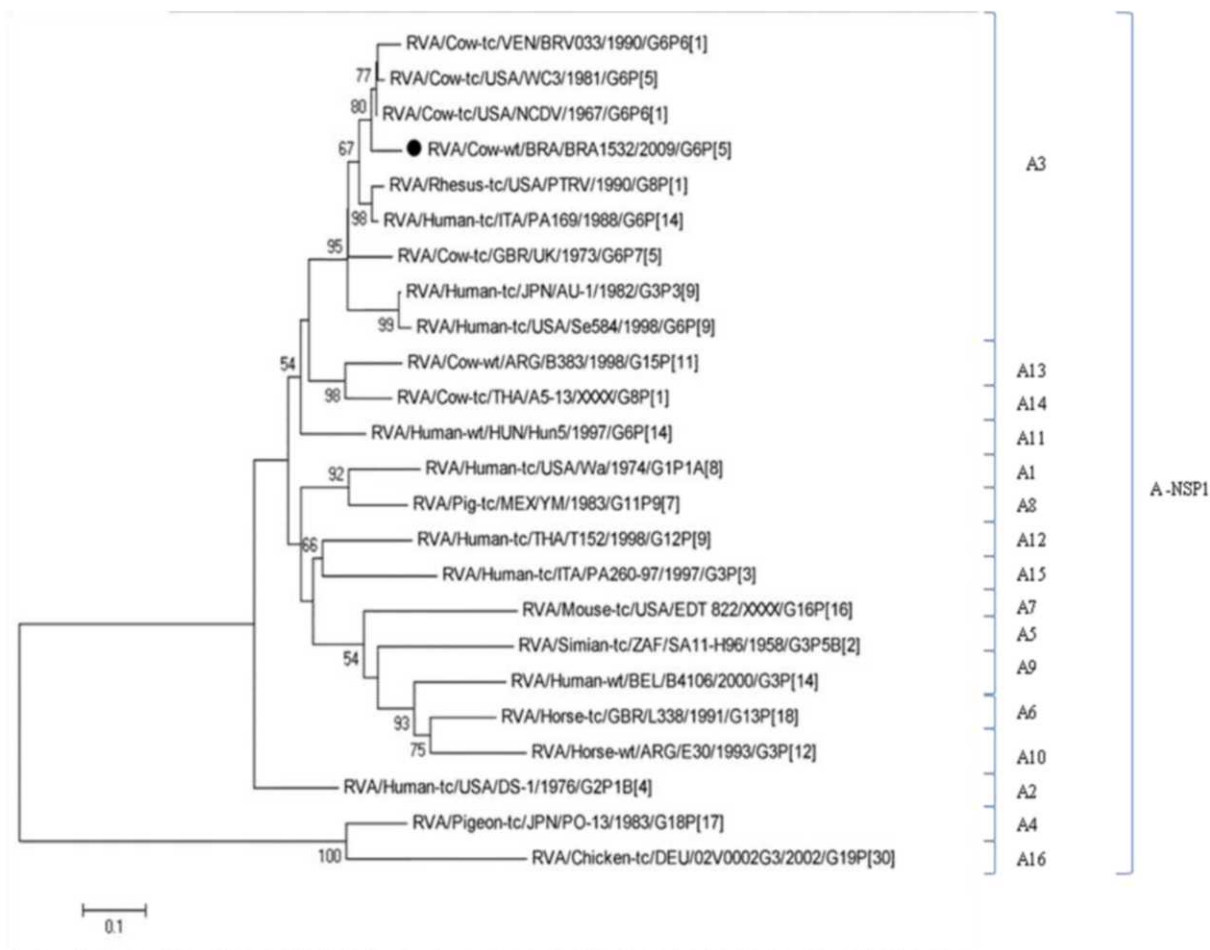
RV-A pertencentes aos genótipos M descritos. Números de acesso no *GenBank* Wa (AY267335), DS-1 (AY277914), AU-1 (DQ490537), PO-13, (AB009631), SA11-H96 (DQ838645), L338 (JF712557), 02V0002G3 (FJ169855), ED_822 (GQ479949), PA169 (EF554128), 111-05-27 (EF554139), PTRV

(FJ422133), NCDV (DQ870495), UK (AY300923), BRV033 (EF560614), WC3 (EF560617), BRA1532/09. Os números adjacentes à árvore representam a porcentagem de bootstraps (de 1000 replicações). Valores de bootstraps abaixo de 50% foram omitidos.



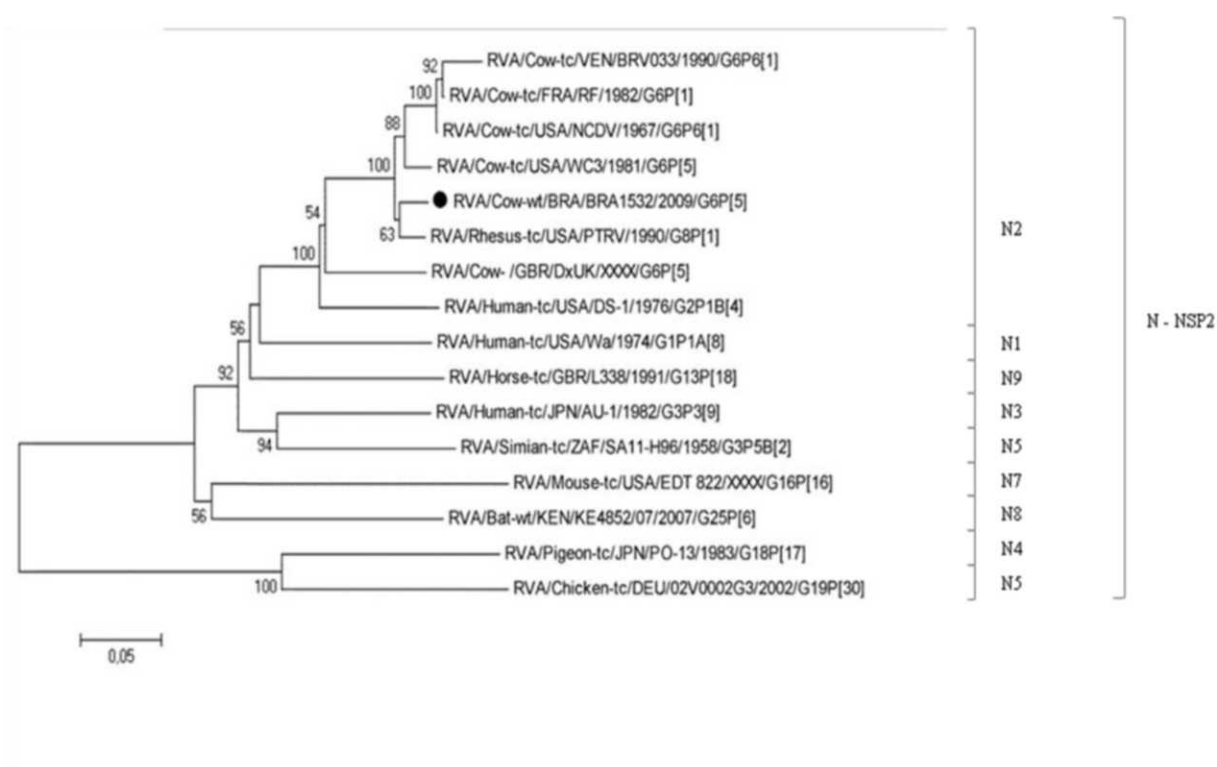
APÊNDICE G

Árvore filogenética baseada na sequência completa com 337 nt (238-574 nt) da proteína NSP1 de RV-A pertencentes aos genótipos A descritos. Números de acesso no *GenBank*: Wa (L18943), DS-1 (L18945), AU-1 (D45244), PO-13, (AB009633), SA11-H96 (DQ838599), L338 (JF712561), ED_822 (GQ479951), YM (D38154), B4106 (AY740735), E30 (JF712572), Hun5 (EF554110), T152 (AB097459), B383 (FJ347117), A5-13 (D38148), PA260-97 (HQ661118), 02V0002G3 (FJ169857), NCDV (HQ186290), PTRV (FJ422135), BRV033 (EF990703), UK (HQ186289), WC3 (EF990699), PA169 (EF554132), Se584 (EF672606), BRA1532/09. Os números adjacentes à árvore representam a porcentagem de bootstraps (de 1000 replicações). Valores de bootstraps abaixo de 50% foram omitidos.



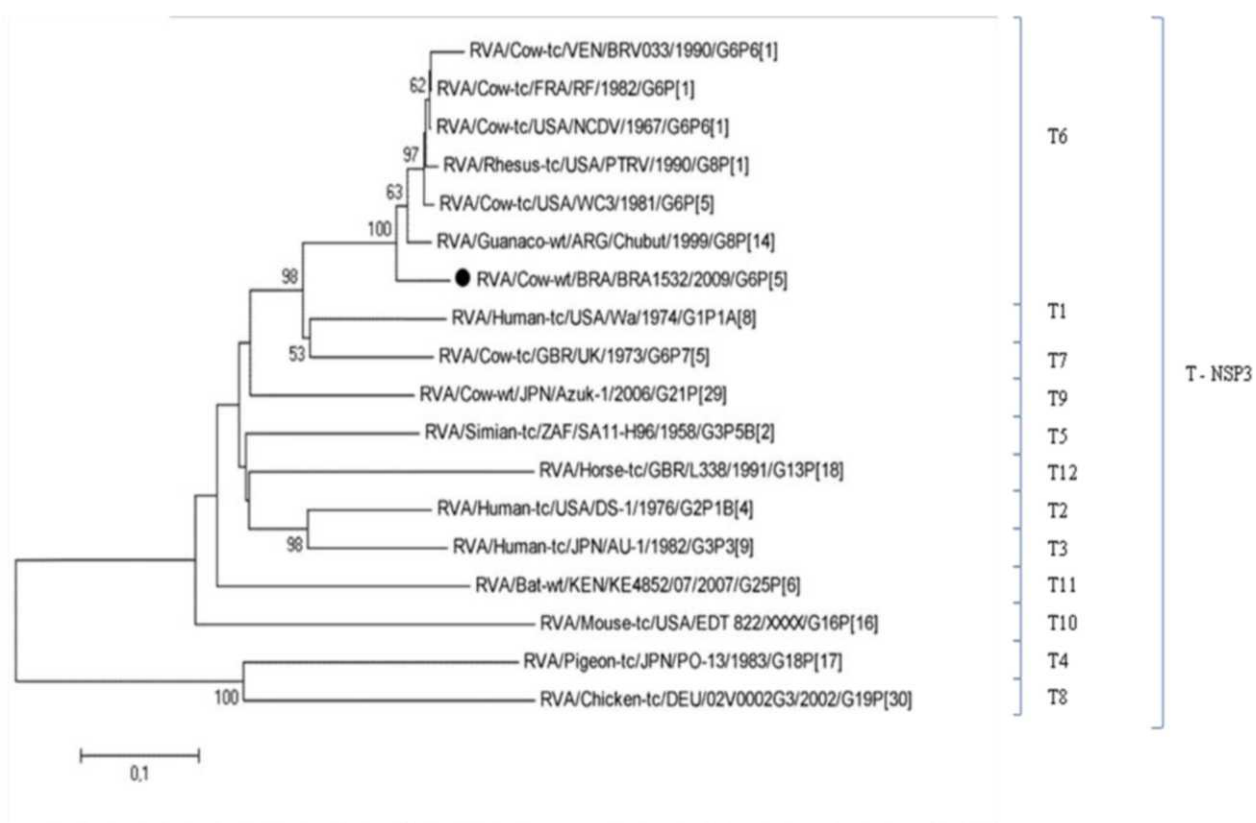
APÊNDICE H

Árvore filogenética baseada na sequência completa com 936 nt (59-994 nt) da proteína NSP2 de RV-A pertencentes aos genótipos N descritos. Números de acesso no *GenBank*: Wa (L04534), DS-1 (L04529), AU-1 (DQ490534), PO-13, (AB009625), SA11-H96 (DQ838615), 02V0002G3 (FJ169860), ED_822 (GQ479954), KE4852 (GU983677), L338 (JF712562), PTRV (FJ422139), NCDV (L04530), BRV033 (EF990704), RF (Z21640), DxUK (GQ225813), WC3 (EF990700), BRA1532/09. Os números adjacentes à árvore representam a porcentagem de bootstraps (de 1000 replicações). Valores de bootstraps abaixo de 50% foram omitidos.



APÊNDICE I

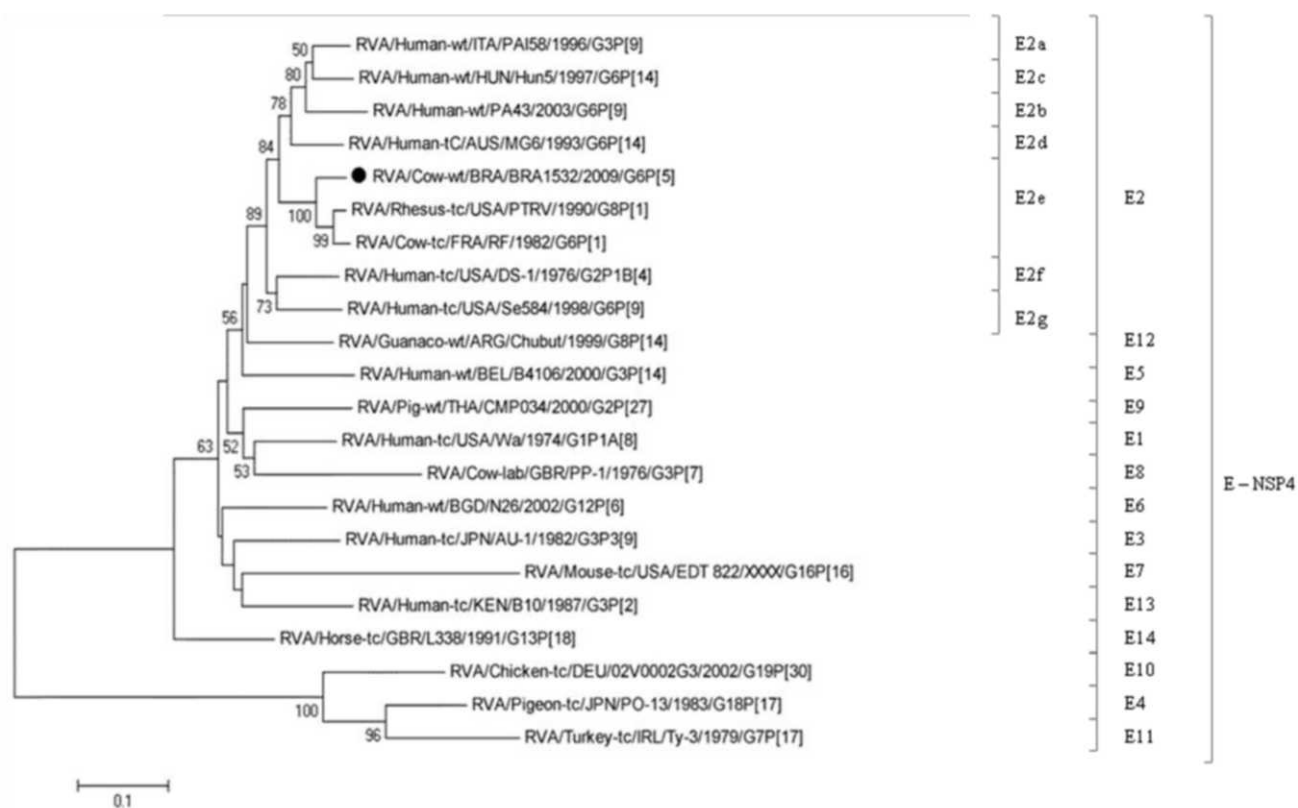
Árvore filogenética baseada na sequência completa com 568 nt (444-1011 nt) da proteína NSP3 de RV-A pertencentes aos genótipos T descritos. Números de acesso no *GenBank*: Wa (X81434), DS-1 (EF136660), AU-1 (DQ490535), PO-13, (AB009626), SA11-H96 (DQ838610), WC3 (EF990701), UK (K02170), 02V0002G3 (FJ169859), Azuk-1 (AB513838), ED_822 (GQ479953), KE4852 (GU983678), L338 (JF712563), WC3 (EF990701), PTRV (FJ422137), NCDV (X81429), BRV033 (EF990705), RF (Z21639), Chubut (FJ347108), BRA1532/09. Os números adjacentes à árvore representam a porcentagem de bootstraps (de 1000 replicações). Valores de bootstraps abaixo de 50% foram omitidos.



APÊNDICE J

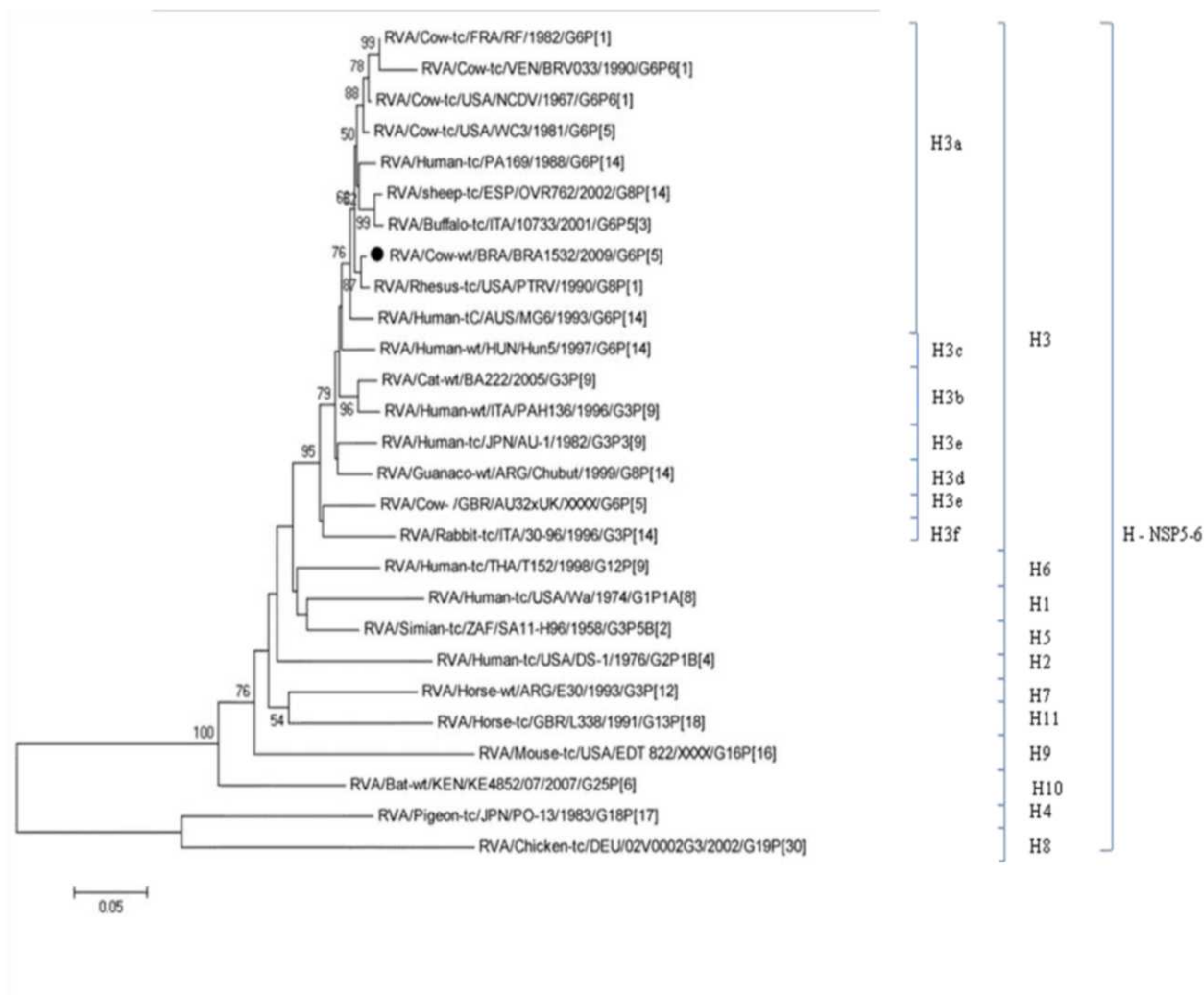
Árvore filogenética baseada na sequência completa com 474 nt (95-568 nt) da proteína NSP4 de RV-A pertencentes aos genótipos E descritos. Números de acesso no *GenBank*: Wa (K02032), DS-1 (AF174305), AU-1 (D89873), PO-13, (AB009627), B4106 (Wa (K02032), DS-1 (AF174305), AU-1 (D89873), PO-13, (AB009627), B4106 (AY740732), N26 (DQ146691), ED_822 (GQ479956), PP-1 (AF427521), CMP034 (DQ534017), 02V0002G3 (FJ169862), Ty-3 (AB065286), Chubut (FJ347109), B10 (HM627562), L338 (JF712564), PA158 (GU296417), PA43 (JF793928), Hun5 (EF554113), MG6 (EF554102), PTRV (FJ422140), RF (AY116593), DS-1 (HQ650125), Se584 (AJ311730), BRA1532/09. Os números adjacentes à árvore representam a porcentagem de bootstraps (de 1000 replicações).

Valores de bootstraps abaixo de 50% foram omitidos.



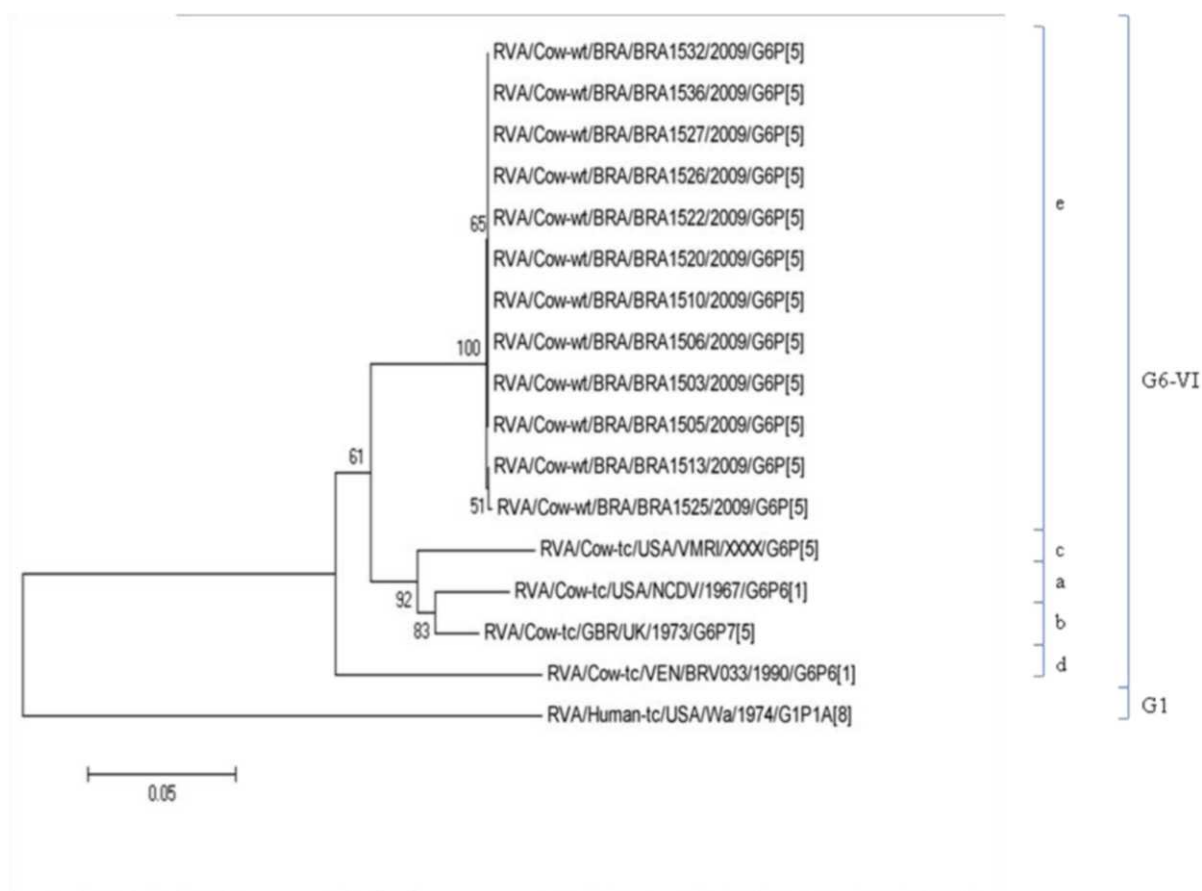
APÊNDICE K

Árvore filogenética baseada na sequência completa com 669 nt (22-690 nt) da proteína NSP5/6 de RV-A pertencentes aos genótipos H descritos. Números de acesso no *GenBank*: Wa (AF306494), DS-1 (M33608), AU-1 (AB008656), PO-13, (AB009628), SA11-H96 (DQ838630), T152 (DQ146706), E30 (JF712576), 02V0002G3 (FJ169863), ED_822 (GQ479957), KE4852 (GU983680), L338 (JF712565), AU-1 (AB008656), OVR762 (EF554158), 10733 (EU659853), PA169 (EF554136), PTRV (FJ422141), B222 (GU827416), PAH136 (GU296418), Hun5 (EF554114), Chubut (FJ347110), AU32xUK (GQ496296), 30-96 (DQ205231), MG6 (EF554103), WC3 (EF990702), RF (AF188126), NCDV (GU937876), BRV033 (EF990706), BRA1532/09. Os números adjacentes à árvore representam a porcentagem de bootstraps (de 1000 replicações). Valores de bootstraps abaixo de 50% foram omitidos.



APÊNDICE L

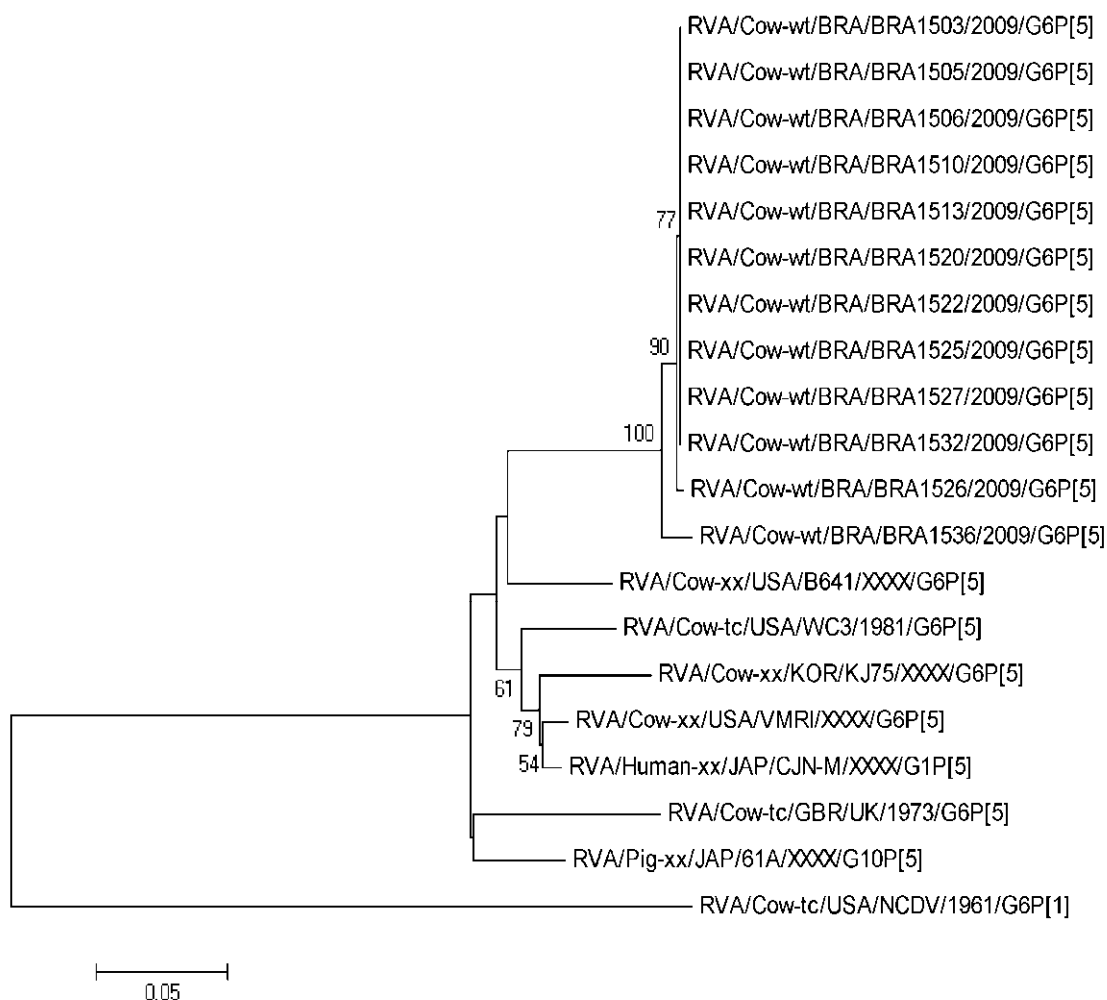
Árvore filogenética com 894pb (63-957nt) da proteína VP7 genotipo G6 linhagem IV com as cepas de BoRV-A brasileiras. Número de acesso (*GenBank*): NCDV (M12394), UK (X00896), BRV033/90 (U62154), B223 (X57852), VMRI (U53924), BRA1503/09, BRA1526/09, BRA1522/09, BRA1505/09, BRA1527/09, BRA1510/09, BRA1506/09, BRA1520/09, BRA1532/09, BRA1536/09, BRA1513/09, BRA1525/09. Os números adjacentes à árvore representam a porcentagem de bootstraps (de 1000 replicações). Valores de bootstraps abaixo de 50% foram omitidos.



APÊNDICE M

Árvore filogenética baseada em sequências com 542 nt (150-691 nt) da proteína VP4 das cepas de BoRV-A brasileiras pertencentes aos protótipos do genótipo P[5], utilizando o método de *neighbor-joining* e o modelo de *Kimura two-parameter*. As sequências VP7 do

RV-A (e seus números de acesso no *GenBank*) são as seguintes: UK (M22306), WC3 (AY050271), VMRI (U53923), CJN-M (D16351), B641 (M63267), G10P5 (U35851), KJ75 (DQ494408), NCDV (AB119636), 61A(D13396), BRA1503/09, BRA1526/09, BRA1522/09, BRA1505/09, BRA1527/09, BRA1510/09, BRA1506/09, BRA1520/09, BRA1532/09, BRA1536/09, BRA1513/09, BRA1525/09 . Os números adjacentes à árvore representam a porcentagem de *bootstrap* (1000 replicações). Valores de *bootstrap* abaixo de 50% foram omitidos.



APÊNDICE N

Matriz de identidade de nucleotídeo 942pb(60-1001nt) entre linhagens e sublinhagens do BoRV-A genotipo G6

Cepas	PA17- Hu/ Ia	Se584- Hu/ Ib	PA27-GV1- Hu/ Ic	PA151- Hu/ Id	Cap455- Ca/IIa	AG6.01- Hu/IIb	B10925- Hu/IIc	PA5- Hu/II d	BP1879- Hu/IIe	RC-18-08- An/II d	Hun3- Hu/III	10733- Bo/III
PA17/03-Hu/Ia	ID	0,956	0,951	0,944	0,808	0,79	0,805	0,811	0,823	0,808	0,872	0,871
Se584/98-Hu/Ib	0,956	ID	0,961	0,964	0,811	0,796	0,813	0,818	0,832	0,816	0,885	0,884
PA27-GV1/93-Hu/Ic	0,951	0,961	ID	0,962	0,815	0,804	0,817	0,822	0,831	0,818	0,891	0,886
PA151/97-Hu/Id	0,944	0,964	0,962	ID	0,816	0,805	0,82	0,825	0,834	0,821	0,884	0,88
Cap455-Ca/IIa	0,808	0,811	0,815	0,816	ID	0,943	0,961	0,96	0,94	0,944	0,811	0,8
AG6.01/96-Hu/IIb	0,79	0,796	0,804	0,805	0,943	ID	0,953	0,946	0,932	0,937	0,805	0,795
B10925/97-Hu/IIc	0,805	0,813	0,817	0,82	0,961	0,953	ID	0,974	0,959	0,964	0,813	0,802
PA5/89-Hu/II d	0,811	0,818	0,822	0,825	0,96	0,946	0,974	ID	0,956	0,979	0,815	0,804
BP1879/03-Hu II-2e	0,823	0,832	0,831	0,834	0,94	0,932	0,959	0,956	ID	0,945	0,821	0,811
RC-18-08-Na/II d	0,808	0,816	0,818	0,821	0,944	0,937	0,964	0,979	0,945	ID	0,814	0,802
Hun3/95-Hu/III	0,872	0,885	0,891	0,884	0,811	0,805	0,813	0,815	0,821	0,814	ID	0,977
10733/01-Bo/III	0,871	0,884	0,886	0,88	0,8	0,795	0,802	0,804	0,811	0,802	0,977	ID
NCDV-Bo/IVa	0,813	0,826	0,823	0,831	0,834	0,828	0,842	0,842	0,838	0,843	0,823	0,819
UK-Bo/IVb	0,808	0,825	0,822	0,832	0,837	0,829	0,848	0,846	0,841	0,845	0,83	0,825
VMRI-Bo/IVc	0,804	0,814	0,813	0,819	0,831	0,82	0,837	0,837	0,835	0,834	0,821	0,819
BRV033/90-Bo/IVd	0,788	0,79	0,79	0,799	0,812	0,804	0,817	0,814	0,808	0,812	0,795	0,792
BRA1532/09-Bo/IVe	0,811	0,825	0,819	0,828	0,84	0,838	0,849	0,847	0,841	0,847	0,825	0,818
BRA1520/09-Bo/IVe	0,808	0,823	0,817	0,825	0,838	0,836	0,847	0,845	0,839	0,845	0,823	0,816
KN-4/93-Bo/V	0,86	0,88	0,88	0,887	0,82	0,813	0,825	0,824	0,831	0,822	0,859	0,858
Hun5/97-Hu/VI	0,807	0,812	0,816	0,815	0,866	0,861	0,87	0,869	0,867	0,869	0,832	0,828
HP113/87-Hu/VII	0,811	0,818	0,817	0,82	0,848	0,843	0,855	0,858	0,857	0,855	0,813	0,811
RUBV319-Bo/ VIII	0,814	0,819	0,812	0,818	0,869	0,86	0,88	0,875	0,875	0,869	0,814	0,807
B223-Bo/ G10	0,744	0,744	0,743	0,745	0,746	0,733	0,752	0,748	0,754	0,752	0,753	0,746

Cepas	NCDV- Bo/IVa	UK- Bo/ IVb	VMRI- Bo/ IVc	BRV033- Bo/IVd	BRA1532- Bo/IVe	BRA1520 Bo/IVe	KN-4- Bo/V	Hun5- Hu/VI	HP113- Hu/VII	RUBV319- Bo/VIII	B22- Bo/G10
PA17/03-Hu/Ia	0,813	0,808	0,804	0,788	0,811	0,808	0,86	0,807	0,811	0,814	0,744
Se584/98-Hu/Ib	0,826	0,825	0,814	0,79	0,825	0,823	0,88	0,812	0,818	0,819	0,744
PA27-GV1/93-Hu/Ic	0,823	0,822	0,813	0,79	0,819	0,817	0,88	0,816	0,817	0,812	0,743
PA151/97-Hu/Id	0,831	0,832	0,819	0,799	0,828	0,825	0,887	0,815	0,82	0,818	0,745
Cap455-Ca/IIa	0,834	0,837	0,831	0,812	0,84	0,838	0,82	0,866	0,848	0,869	0,746
AG6.01/96-Hu/IIb	0,828	0,829	0,82	0,804	0,838	0,836	0,813	0,861	0,843	0,86	0,733
B10925/97-Hu/IIc	0,842	0,848	0,837	0,817	0,849	0,847	0,825	0,87	0,855	0,88	0,752
PA5/89-Hu/II d	0,842	0,846	0,837	0,814	0,847	0,845	0,824	0,869	0,858	0,875	0,748
BP1879/03-Hu II-2e	0,838	0,841	0,835	0,808	0,841	0,839	0,831	0,867	0,857	0,875	0,754
RC-18-08-Na/II d	0,843	0,845	0,834	0,812	0,847	0,845	0,822	0,869	0,855	0,869	0,752
Hun3/95-Hu/III	0,823	0,83	0,821	0,795	0,825	0,823	0,859	0,832	0,813	0,814	0,753
10733/01-Bo/III	0,819	0,825	0,819	0,792	0,818	0,816	0,858	0,828	0,811	0,807	0,746
NCDV-Bo/IVa	ID	0,959	0,929	0,901	0,92	0,918	0,819	0,82	0,833	0,83	0,734
UK-Bo/IVb	0,959	ID	0,946	0,912	0,93	0,928	0,829	0,833	0,828	0,833	0,73
VMRI-Bo/IVc	0,929	0,946	ID	0,888	0,914	0,911	0,82	0,817	0,825	0,83	0,738
BRV033/90-Bo/IVd	0,901	0,912	0,888	ID	0,89	0,888	0,799	0,816	0,801	0,804	0,727
BRA1532/09-Bo/IVe	0,92	0,93	0,914	0,89	ID	0,997	0,819	0,824	0,821	0,834	0,743
BRA1520/09-Bo/IVe	0,918	0,928	0,911	0,888	0,997	ID	0,817	0,822	0,819	0,832	0,74
KN-4/93-Bo/V	0,819	0,829	0,82	0,799	0,819	0,817	ID	0,82	0,798	0,806	0,746
Hun5/97-Hu/VI	0,82	0,833	0,817	0,816	0,824	0,822	0,82	ID	0,84	0,855	0,746
HP113/87-Hu/VII	0,833	0,828	0,825	0,801	0,821	0,819	0,798	0,84	ID	0,897	0,744
RUBV319-Bo/ VIII	0,83	0,833	0,83	0,804	0,834	0,832	0,806	0,855	0,897	ID	0,743
B223-Bo/ G10	0,734	0,73	0,738	0,727	0,743	0,74	0,746	0,746	0,744	0,743	ID

Número de acesso (*GenBank*): PA17/03 (JF793943), Se584/98 (EF672609), PA27-GV1/93 (JF793942), PA151/97 (L20881), RC-18-08 (FJ495133), BP1879/03 (FN665685), PA5/89 (JF793945), B10925/97 (EF554120), Cap455 (AY128708), AG6.01/96 (AF207063), 10733/01 (AY281360), Hun3/95 (AJ487831), NCDV (M12394), UK (X00896), BRV033/90 (U62154), KN-4/93 (D12710), Hun5/97 (EF554109), HP113/87 (DQ003292), RUBV319 (EF199501), B223 (X57852), VMRI (U53924), BRA1520/09, BRA1532/09.

APÊNDICE O

Número de acesso (*GenBank*): PA17/03 (JF793943), PA43/03 (JF793944), Hun7 (AJ488134), B1711 (AF532202), R353 (DQ122400), Se584/98 (EF672609), PA27-GV1/93 (JF793942), PA151/97 (L20881), BP1879/03 (FN665685), RC-18-08 (FJ495133), PA5/89 (JF793945), 111-05-27/05 (EF554142), PA77/02 (JF793946), B10925/97 (EF554120), Cap455 (AY128708), AG6.01/96 (AF207063), ASG6.02 (AF421183), B102 (DQ631815), 10733/01 (AY281360), Hun3/95 (AJ487831), Hun4/96 (AJ487833), RotaTeq-WI79-4/92 (GU565046), NCDV (M12394), UK (X00896), BRV033/90 (U62154), KN-4/93 (D12710), Hun5/97 (EF554109), HP113/87 (DQ003292), HP140/87 (DQ003293), RUBV319 (EF199501), IND (U15000), RF (X65940), B223 (X57852), CIT39A/02 (AY629556), WC3 (AY050272), VMRI (U53924), BRA1520/09, BRA1532/09.

Porcentagem da distância de nucleotídeos 926 pb(60-985 nt) entre linhagens e sublinhagens do BoRV-A genótipo G6 ^a																				
Lineages	I-a	I-b	I-c	I-d	II-a	II-b	II-c	II-d	II-e	III	IV-a	IV-b	IV-c	IV-d	IV-e	V	VI	VII	VIII	G10
I-a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
I-b	4.12 ^b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
I-c	4.9	3.9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
I-d	5.38	3.7	3.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
II-a	23.02	22.7	21.9	21.9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
II-b	24.62	23.7	22.45	22.3	5.25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
II-c	23.14	22.2	21.4	21.1	3.8	4.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
II-d	22.26	21.57	20.8	20.5	5.07	5.6	3.35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
II-e	20.6	19.4	19.4	19.1	6.2	6.75	4.3	5.32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
III	14.87	13.55	12.7	13.82	23.2	23.3	22.8	22.48	21.75	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IV-a	21.64	20.22	20.47	19.42	18.82	19.46	17.98	17.72	18.78	21.41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IV-b	22.84	20.65	21.1	19.75	19.2	19.45	17.55	17.98	18.4	21.19	5.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IV-c	22.95	21.76	21.97	21.04	18.9	19.48	17.64	17.84	18.1	21.88	7.8	5.74	-	-	-	-	-	-	-	-
IV-d	25.2	25.3	25.3	24	22.4	22.7	21.6	22.12	22.8	25.15	11.08	9.45	11.27	-	-	-	-	-	-	-
IV-e	22.13	20.65	21.45	20.35	18.75	17.98	17.35	17.46	18.4	21.68	8.9	7.9	9.22	12.15	-	-	-	-	-	-
V	15.64	13.5	13.4	12.6	21.3	21.35	20.3	20.68	19.5	16.52	20.68	20.25	21.17	24	21.65	-	-	-	-	-
VI	22.6	22.2	21.4	21.8	15.2	14.9	14.4	14.68	14.8	20.12	20.92	19.6	20.5	21.7	20.95	20.9	-	-	-	-
VII	22.76	21.25	21.3	21	17.85	18.15	17.2	16.82	16.75	22.73	20	20.68	20.58	24	21.35	24.55	18.65	-	-	-
VIII	22.18	21.4	22.4	21.6	15.1	15.25	13.5	14.75	14	22.7	20.12	19.95	19.77	23.6	19.75	23.4	16.7	11.45	-	-
G10	32.14	31.9	32.3	31.7	31.8	32.65	30.5	30.75	30.1	31.25	33.25	34.3	33.4	34.8	32.45	31.9	32	32	32.5	-

^a Porcentagens de distâncias são expressas em valores médios.

^b Distância entre sublinhagens estão em negrito