



**UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA**

ELIS LORENZETTI

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ROTAVÍRUS
GENOTIPO P[6] DE ORIGEM HUMANA EM UM FOCO DE
DIARREIA NEONATAL SUÍNA**

Londrina
2010

ELIS LORENZETTI

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ROTAVÍRUS
GENOTIPO P[6] DE ORIGEM HUMANA EM UM FOCO DE
DIARREIA NEONATAL SUÍNA**

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

Orientador: Prof. Dr. Amauri Alcindo Alfieri

Londrina
2010

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

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

L869c Lorenzetti, Elis.

Caracterização molecular de rotavírus genotipo P[6] de origem humana em um foco de diarreia neonatal suína / Elis Lorenzetti. – Londrina, 2010. xv, 79 f. : il.

Orientador: Amauri Alcindo Alfieri.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2010.

Inclui bibliografia.

1. Leitão (Suíno) – Doenças – Teses. 2. Diarreia em suínos – Teses. 3. Rotavírus – Teses. 4. Virologia veterinária – Teses. I. Alfieri, Amauri Alcindo. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

CDU 619:636.4

ELIS LORENZETTI

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ROTAVÍRUS
GENOTIPO P[6] DE ORIGEM HUMANA EM UM FOCO DE
DIARREIA NEONATAL SUÍNA**

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

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Elisabete Takiuchi
Universidade Federal do Paraná - Campus Palotina

Prof. Dr. Marco Antonio Bacellar Barreiros
Universidade Federal do Paraná - Campus Palotina

Prof. Dr. Amauri Alcindo Alfieri
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 20 de Abril de 2010.

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 do Prof. Dr. Amauri Alcindo 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**

DEDICATÓRIA

A Deus

Aos meus pais Ari Lorenzetti e Ilene Maria Delai Lorenzetti

Aos meus avós paternos Fermino Lorenzetti (*in memorian*) e Deolinda Scussel Lorenzetti

Aos meus avós maternos Marciano Delai e Generosa Motter Delai

Ao meu irmão Clécio Lorenzetti

Ao meu namorado Fábio Morotti

Enfim, a toda minha família.

AGRADECIMENTOS

A Deus, fonte imensurável de amor, criador do mundo e de todas as maravilhas, por ter me dado a vida e por iluminar meus passos.

À natureza por estar em toda e qualquer parte alimentando a felicidade das pessoas que a olham e imaginam um futuro melhor.

Ao professor e orientador Dr. Amauri Alcindo Alfieri, pelo exemplo de dedicação e profissionalismo. Agradeço pela orientação, paciência, pela oportunidade e principalmente pela coragem de me orientar.

À Prof. Dr^a. Alice Fernandes Alfieri pelo exemplo de profissionalismo, carinho e confiança em mim depositada.

Aos membros da banca de qualificação: Prof. Dr. João Luís Garcia e Prof^a. Dr^a. Alice Fernandes Alfieri, pelas importantes sugestões e contribuições. Aos membros da banca de defesa Prof^a. Dr^a. Elisabete Takiuchi e Prof. Dr. Marco Antonio Bacellar Barreiros.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal pela formação acadêmica científica.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de Mestrado.

Às técnicas de laboratório Dalíria do Prado, Kerlei Cristina Médici e Maria Yoshie Yoshikawa, pelo carinho, ensinamento, incentivo, amizade e momentos de descontração, que com certeza foram fundamentais.

À secretária Helenice, pela paciência e ajuda, e todos os funcionários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva.

A todos os amigos e companheiros de Pós-graduação pelas conversas, risadas e bons momentos vividos.

À toda minha família, mas de modo especial aos meus pais, pelo exemplo que são de honestidade, bondade, pelo carinho, pelo incentivo e principalmente por entenderem as minhas escolhas e compreenderem que a privação do convívio diário seria necessária para minha formação. Ao meu irmão pelos momentos inesquecíveis que vivemos e continuaremos vivendo juntos. À minha "irmãzinha" tica (*in memoriam*), por me ensinar o valor de uma amizade, e aos meus outros amigos caninos, tica, pita, tuca, pantera e carrerinha.

Ao meu namorado Fábio, pela compreensão, carinho, cumplicidade e apoio nas decisões difíceis e toda sua família pela hospitalidade, carinho e paciência.

Aos companheiros e amigos do Laboratório de Virologia Animal, Aline, Cecília, Cláudia, Danilo, Marlise, Michele, Noemi, Patrícia, Rodrigo, Stelamaris e Thais pelas conversas, reflexões, convívio, amizade e auxílios que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho. As residentes Aline e Juliana, pela ajuda e apoio. À Juliana Dias pela amizade, incentivo e auxílio prestados desde os tempos de estágio. A todos os estagiários do Laboratório de Virologia Animal.

À minha amiga Ana Angelita Sampaio Baptista, pelo convívio, auxílio, companhia, risadas e principalmente pelos conselhos em momentos de angústia e indecisão.

Ao professor Laurival Antônio Vilas Boas, pela paciência, incentivo e disponibilidade durante a realização deste trabalho.

Aos professores Fábio Juliano Negrão e Sheila Rezler Wosiacki, pelo estímulo e esforços prestados para que fosse possível a realização dos estágios no Laboratório de Virologia Animal da UEL.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada.

"Dois importantes fatos, nesta vida, saltam aos olhos; primeiro, que cada um de nós sofre inevitavelmente derrotas temporárias, de formas diferentes, nas ocasiões mais diversas. Segundo, que cada adversidade traz consigo a semente de um benefício equivalente. Ainda não encontrei homem algum bem-sucedido na vida que não houvesse antes sofrido derrotas temporárias. Se 'derrotas' acontecerem, que elas não nos abalem. Antes, sejam encaradas como um aprendizado, na conquista de vitórias. Sempre é tempo de recomeçar. Quem caminha descalço não deve semear espinhos". (Andrew Carnegie a Napoleon Hill e G. Hebert).

LORENZETTI, E. **Caracterização molecular de rotavírus genotipo P[6] de origem humana em um foco de diarreia neonatal suína.** 2010. 90f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2010.

RESUMO

Um dos principais problemas sanitários que acomete as criações de leitões em todo o mundo é a diarreia neonatal. O rotavírus suíno sorogrupo A (PoRV-A) é uma etiologia viral frequentemente detectada nos episódios de diarreia em leitões lactentes e recém-desmamados em sistemas de produção intensivo. Para controlar a infecção são preconizadas várias ações de manejo sanitário, incluindo a vacinação das matrizes. Entretanto, a grande diversidade antigênica encontrada nas estirpes de PoRV-A podem ser responsáveis por falhas vacinais. As proteínas VP7 e VP4, presentes na camada externa do capsídeo viral do RV-A, apresentam importante ação na imunidade induzindo anticorpos neutralizantes. Com base nas características moleculares dos genes que codificam as proteínas VP7 e VP4, os RV-A podem ser classificados em genótipos G e P, respectivamente. Dentre os genótipos P identificados em estirpes de PoRV-A, o genótipo P[6] destaca-se pela sua frequência de ocorrência e pela grande diversidade. Até o momento foram descritas cinco linhagens (I-V) e oito sublinhagens (Ia-If; Va-Vb) do genótipo P[6] em estirpes de RV-A de origem humana e suína. Este estudo teve por objetivo a caracterização molecular do genótipo P (gene VP4) presente em estirpes de PoRV-A identificadas em um foco de diarreia neonatal em suínos. O foco ocorreu em uma granja altamente tecnificada, localizada no estado de Santa Catarina, com esquema de vacinação regular contra a rotavirose suína. Foram colhidas 80 amostras de fezes sendo 49 diarreicas e 31 normais (controle). As amostras foram colhidas de leitões lactentes (≤ 57) e recém-desmamados (≤ 23). O diagnóstico de rotavírus foi realizado por ss-PAGE e RT-PCR. As amostras positivas foram genotipadas por multiplex-esféi-PCR utilizando *primers* genótipo P-específicos e sequenciadas para a definição da epidemiologia molecular da infecção. Foram identificadas 22 (27,5%) amostras fecais positivas para o PoRV-A sendo 16 (72,7%) provenientes de animais com diarreia e 6 (27,3%) de animais assintomáticos. O PoRV-A foi identificado em leitões de todas as faixas etárias incluídas no estudo. Vinte estirpes de PoRV-A identificadas foram classificadas como genótipo P[6] de origem humana pois foram amplificadas (267 pb) com o *primer* desenhado para a amplificar estirpes *M37-like* de RV-A de origem humana. Nenhuma das amostras foi amplificada com o *primer* desenhado especificamente para amplificação de estirpes de RV-A genótipo P[6] de origem suína (estirpe Gottfried). A análise da sequência de nucleotídeos e a reconstrução da árvore filogenética, realizada em quatro amostras permitiram a classificação de duas estirpes virais (BRA838/07-Po e BRA844/07-Po) como pertencentes ao genótipo P[6] linhagem I, sublinhagem Ie e outras duas estirpes (BRA843/07-Po e BRA898/07-Po) como sublinhagem If. Os genótipos P[6]-Ie e If foram recentemente descritos em estirpes de RV-A de origem humana. Essa é a primeira descrição de estirpes de PoRV-A genótipos P[6]-Ie e If identificadas em um foco de diarreia neonatal em suínos. Estes resultados sugerem que o foco de diarreia pode ter resultado da transmissão interespecie do RV-A. A vacinação intensiva das matrizes com vacina comercial contendo o genótipo P[6] de origem suína (estirpe Gottfried) pode ter influenciado na seleção desses genótipos, até então somente descritos em estirpes virais de origem humana. A possibilidade da ocorrência de infecções heterólogas, em situação de pressão imunológica, alerta ainda para a necessidade do constante monitoramento das características antigênicas e moleculares de estirpes de PoRV-A identificadas em surtos de diarreia neonatal em rebanhos suínos regularmente vacinados contra a rotavirose.

Palavras-chave: Leitões. Rotavírus sorogrupo A. Gene VP4. Genótipo P[6].

LORENZETTI, E. **Molecular characterization of rotavirus strains P[6] genotype of human origin in a porcine neonatal diarrhea outbreak.** 2010. 90p. Dissertation (Master's Degree in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2010.

ABSTRACT

Neonatal diarrhea is the major piglet health problem in swine production systems worldwide. In intensive production the porcine serogroup A rotaviruses (PoRV-A) are common cause of diarrhea in suckling and recently weaned piglets. The VP4 and VP7 proteins of the outer layer viral capsid of RV-A are relevant for immunity against rotavirus infection by inducing neutralizing antibodies. According to the antigenic and molecular characteristics of the genes that encode VP4 and VP7 proteins, the RV-A strains can be classified in genotypes P and G, respectively. In the modern swine production the main health management to control the PoRV-A infections is the sows vaccination. However, the diversity of G (VP7) and P (VP4) genotypes identified in wild-type PoRV-A strains can be responsible for vaccine failures. Despite of several P genotypes identified in PoRV-A strains, the P[6] genotype is considered important for the frequency and for the great antigenic diversity. So far, have been described 5 lineages (I-V) and 8 sublineages (Ia-If; Va-Vb) of P[6] genotype in RV-A strains of human and porcine origin. The present study was developed to detect P genotype (VP4 gene) in PoRV-A strains identified during an outbreak of diarrhea in piglets. The outbreak occurred in a pig farm located in the state of Santa Catarina, South area of Brazil that presented good management practices and regular vaccination against porcine rotaviruses. Were collected 80 fecal samples being 49 diarrheic and 31 with normal consistency (control group). Were evaluated 57 stool samples of suckling (< 3-week-old) and 23 of recently-weaned (4-week-old) piglets. PoRV-A diagnosis was carried out by silver-stained polyacrylamide gel electrophoresis and RT-PCR assay. Positive samples were genotyping by multiplex-nested-PCR with genotype-specific primers and four PoRV-A strains were sequenced to define the molecular epidemiology of the infection. During this study were identified 22 (27.5%) PoRV-A positive stool samples of which 16 (72.7%) were from symptomatic and 6 (27.3%) from asymptomatic piglets. PoRV-A was detected in fecal samples either from suckling as weaned piglets. In all the 20 wild-type PoRV-A strains included in this study were only amplified a PCR products with 267 bp length that belong to the P[6] genotype present in RV-A strains of human origin (M37-like strains). The sequencing and phylogenetic analysis carried out in a 586 bp length product of the VP4 gene (VP8*) of four Brazilian wild-type PoRV-A strains allowed to classify two P[6] strains (BRA838/07-Po and BRA844/07-Po) as P[6]-Ie genotype and the other two P[6] strains (BRA843/07-Po and BRA898/07-Po) as P[6]-If genotype. The genotype sublineages P[6]-Ie and If were recently described in RV-A strains of human origin. This is the first description of P[6]-Ie and If genotypes in RV-A strains of porcine origin. These findings suggest that the neonatal diarrhea outbreak might have been resulted of interspecies transmission of RV-A. The regularly vaccination of the sows with a rotavirus commercial vaccine containing P[6] genotype of porcine origin (Gottfried strain) might have provide the disappearance of the genotype P[6]-II (Gottfried-like) of porcine origin and the selection of RV-A strains with VP4 gene described only in RV-A strains of human origin such as P[6]-Ie and If. Heterologous infections are described in rotavirus infections in human beings and in animals. Rotavirus vaccination fails can occur in RV-A infections with virus strains carrying P and/or G genotypes different from those presents in the vaccine. The neonatal diarrhea outbreak in a regularly vaccinated pig herd and the characterization of PoRV-A strains with atypical P genotypes described in this study highlight the importance of the epidemiological studies of human and animal rotaviruses.

Keywords: Piglets. RV-A. VP4 gene. P[6] genotype.

LISTA DE FIGURAS

Revisão de Literatura

- Figura 1** – Eletroforese em gel de poliacrilamida do genoma do rotavirus, RNA fita dupla, segmentado (A) e as proteínas codificadas por cada segmento genômico (B). Partícula de rotavirus representada esquematicamente (C); partícula de rotavirus e sua estrutura determinada por eletromicroscopia associada ao processamento de imagem por computador (D)..... 18
- Figura 2** – Reconstrução da árvore filogenética baseada em sequências parciais com 505 nt (200-704 nt) do gene VP4 do RV-A pertencentes aos protótipos das linhagens do genotipo P[6], utilizando o método de *neighbor-joining* e o modelo de *Kimura two-parameter*. As sequências VP4 do RV-A (e seus números de acesso no *GenBank*) são as seguintes: M37 (L20877), Gottfried (M33516), AU19 (AB017917), BP1198/98 (AJ621504), BP720/93 (AJ621503), OSU (X13190)- *outgroup*. Abreviações: Hu, humano; Po, suíno..... 25
- Figura 3** – Reconstrução da árvore filogenética baseada em sequências parciais com 587 nt (111-697 nt) do gene VP4 do RV-A pertencentes ao genotipo P[6], demonstrando a presença das linhagens e sublinhagens, utilizando o método de *neighbor-joining* e o modelo de *Kimura two-parameter*. As sequências parciais do gene VP4 do RV-A e os números de acesso no *GenBank* são os seguintes: M37 (L20877), RV3 (U16299), 1076 (M88480), NB244/97 (DQ822476), 128/07-34 (EU734175), 221/04-7 (AY955303), 134/04-8 (AY955301), VN846/2003 (EF179117), 134/04-11 (AY955300), KH210 (AB271687), ES51/04 (AY955306), EC2184 (GQ149094), NB150/97 (DQ299877), ARG4671 (FJ712691), Gottfried (M33516), JP29-6 (AB176688), BP1198/98 (AJ621504), 221/04-20 (AY955308), 134/04-7 (AY955310), BP720/93 (AJ621503), OSU (X13190)-*outgroup*. Abreviações: Hu, humano; Po, suíno..... 26

Detection of a human-like rotavirus P[6] genotype in a neonatal diarrhea outbreak in a regularly vaccinated pig herd

Figure 1 – Electrophoretic migration pattern of RNAs, Brazilian P[6] genotype (P[6]-Gottfried-like and P[6]-M37-like) rotaviruses strains, finding in porcine stool samples, analyzed by electrophoresis in 7,5% polyacrylamide gel and visualized by staining with silver nitrate. Lane 1, P[6]-Gottfried-like genotype electropherotype "long"; lane 2 and 3, P[6]-M37-like genotype electropherotype "short"58

Figure 2 – RT-PCR and multiplex-nested-PCR assays of porcine group A Rotavirus VP4 gene in fecal specimes from piglets in an outbreak of neonatal diarrhea. Lane M1, molecular weight marker 123 bp ladder (Invitrogen™ Life Techonologies, USA); lane 1, porcine VP4 consensus group A rotavirus with 876 bp; lane 2, porcine P[6] genotype pattern (Gottfried); lane 3 and 4, negative specimens by multiplex-nested-PCR using primers animal pool; lane 5, human P[6] genotype pattern (M37); lane 6, amplified product the multiplex-nested-PCR using primers human pool (P[6]-Ie); lane 7, amplified product of multiplex-nested- PCR using primers human pool (P[6]-If); lane 8, negative control; lane M2, molecular weight marker 100 bp ladder (Invitrogen™ Life Techonologies, USA)59

Figure 3 – Phylogenetic analysis of the VP4 (nt 111-696) genes from Brazilian P[6] genotype rotaviruses strains and another strains described in worldwide. The tree was constructed using neighbor-joining for tree reconstruction and Kimura two- parameter as a nucleotide substitution model. Bootstrap values are shown at the branch nodes (values <70% not shown). The Brazilian P[6]-Ie strains isolated from 2007 are marked with a filled circle and the P[6]-If with a filled diamond. Sequences used in the alignment were acquired from GenBank as follows accession numbers: M37 (L20877), 128/07-34 (EU734175), 134/04-8 (AY955301), 134/04-11 (AY955300), KH210 (AB271687), ES51/04 (AY955306), EC2184 (GQ149094), NB150/97 (DQ299877), ARG4671 (FJ712691), Gottfried (M33516), JP29-6 (AB176688), BP1198/98 (AJ621504), 221/04-20 (AY955308), 134/04-7 (AY955310), BP720/93 (AJ621503), OSU (X13190)-outgroup. Abbreviations: Hu, human Po, porcine ...60

LISTA DE QUADROS

Revisão de Literatura

Quadro 1 – Estirpes padrão de RV-A genotipo P[6] de origem humana e suína. Número de acesso (<i>GenBank</i>): M37 (L20877), 1076 (M88480), ST3 (L33895), Gottfried (M33516), AU-19 (AB017917), JP29-6 (AB176688), ST3 (L33895)	22
--	----

SUMÁRIO

1 REVISÃO DE LITERATURA	16
INTRODUÇÃO.....	16
ROTAVIRUS	17
ROTAVIRUS SOROGRUPO A (RV-A).....	19
RV-A SUINO (PoRV-A)	20
RV-A GENOTIPO P[6]	21
RV-A - LINHAGENS E SUBLINHAGENS GENÉTICAS DO GENOTIPO P[6]	25
RELAÇÃO ENTRE PoRV-A E HuRV-A	28
VACINAS E VACINAÇÃO.....	31
REFERÊNCIAS	34
2 OBJETIVOS	43
2.1 OBJETIVO GERAL.....	43
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
3 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO	44
DETECTION OF A HUMAN-LIKE ROTAVIRUS P[6] GENOTYPE IN A NEONATAL DIARRHEA OUTBREAK IN A REGULARLY VACCINATED PIG HERD	45
Abstract.....	46
Introduction	47
Materials and Methods	49
<i>Herd and outbreak</i>	49
<i>Stool samples and selection criteria</i>	50
<i>RNA extraction</i>	50
<i>RT-PCR</i>	51
<i>Multiplex-nested-PCR</i>	51
<i>Analysis of amplified products</i>	51
<i>Sequencing and phylogenetic analysis</i>	52

Results	52
Discussion.....	54
References	61
4 CONCLUSÕES.....	66
ANEXOS	67
ANEXO A – Reconstrução da árvore filogenética baseada em sequências parciais com 830 nt (37-866 nt) nucleotídeos do gene VP4 do RV-A pertencentes aos protótipos dos P genótipos descritos. As sequências VP4 do RV-A (e seus números de acesso no <i>GenBank</i>) são as seguintes: NCDV (AB119636), SA11 (M23188), RRV (M18736), L26 (M58292), UK (M22306), Gottfried (M33516), M37 (L20877), OSU (X13190), Wa (L34161), AU1 (D10970), 69 M (M60600), B223 (D13394), H-2 (L04638), MDR13 (L07886), Sun9 (AB158430), Lp14 (L11599), EDIM (AF039219), PO-13 (AB009632), L338 (D13399), Mc345 (D38054), EHP (U08424), Hg18 (AF237665), 160/01 (AF526374), 34461-4 (AY768809), TUCH (AY596189), Dhaka6 (AY773004), 134/04-15 (DQ061053), CMP034 (DQ534016), P21-5 (DQ629926), 344-04-1 (DQ242615), Ecu534 (EU805773), AzuK-1 (AB454420), Ch-2G3 (EU486956), Ch-661G1 (EU486962). Abreviações: Bo, bovino; Ch, frango; Eq, equino; Hu, humano; Mu, murino; Ov, ovino; Pi, pombo; Po, suíno; Si, símio.....	68
ANEXO B – Reconstrução da árvore filogenética baseada em sequências parciais com 689 nt (103-791 nt) nucleotídeos do gene VP4 do RV-A pertencentes ao genótipo P[6], incluindo as estirpes descritas neste estudo. As sequências parciais do gene VP4 do RV-A e os números de acesso no <i>GenBank</i> são os seguintes: M37 (L20877), Gottfried (M33516), OSU (X13190)- <i>outgroup</i> . Abreviações: Hu, humano; Po, suíno	70
ANEXO C – Reconstrução da árvore filogenética com estirpes descritas neste estudo baseada em sequências parciais com 505 nt (200-704 nt) nucleotídeos do gene VP4 do RV-A pertencentes ao genótipo P[6], demonstrando a	

presença das linhagens. As sequências parciais do gene VP4 do RV-A e os números de acesso no *GenBank* são os seguintes: M37 (L20877), Gottfried (M33516), AU19 (AB017917), BP1198/98 (AJ621504), BP720/93 (AJ621503), OSU (X13190)-ouígroup. Abreviações: Hu, humano; Po, suíno 71

ANEXO D – Reconstrução da árvore filogenética incluindo estirpes descritas neste estudo, baseada em sequências parciais com 587 nt (111-697 nt) nucleotídeos do gene VP4 do RV-A pertencentes ao genotipo P[6], demonstrando a presença das linhagens e sublinhagens. As sequências parciais do gene VP4 do RV-A e os números de acesso no *GenBank* são os seguintes: M37 (L20877), RV3 (U16299), 1076 (M88480), NB244/97 (DQ822476), 128/07-34 (EU734175), 221/04-7 (AY955303), 134/04-8 (AY955301), VN846/2003 (EF179117), 134/04-11 (AY955300), KH210 (AB271687), ES51/04 (AY955306), EC2184 (GQ149094), NB150/97 (DQ299877), ARG4671 (FJ712691), Gottfried (M33516), JP29-6 (AB176688), BP1198/98 (AJ621504), 221/04-20 (AY955308), 134/04-7 (AY955310), BP720/93 (AJ621503), OSU (X13190)-ouígroup. Abreviações: Hu, humano; Po, suíno 72

ANEXO E – Matriz de identidade parcial do gene VP8* 586 nt (111-696 nt) de novas estirpes genotipo P[6] com representantes das linhagens e sublinhagens do RV-A. Número de acesso (*GenBank*): M37 (L20877), 128/07-34 (EU734175), 134/04-8 (AY955301), 134/04-11 (AY955300), KH210 (AB271687), ES51/04 (AY955306), EC2184 (GQ149094), NB150/97 (DQ299877), ARG4671 (FJ712691), Gottfried (M33516), JP29-6 (AB176688), BP1198/98 (AJ621504), 221/04-20 (AY955308), 134/04-7 (AY955310), BP720/93 (AJ621503), OSU (X13190)-oufgroup. Abreviações: Hu, humano; Po, suíno 73

ANEXO F – Porcentagem de distância de nucleotídeos (111-693 nt) entre linhagens e sublinhagens do RV-A genotipo P[6]. Número de acesso (*GenBank*): NB244/97 (DQ822476), MW23 (AJ278253), HST369/99 (DQ525200), US1205 (AF079356), 1076 (M88480), RV3 (U16299), ST3 (L33895),

M37 (L20877), ES51/04 (AY955306), ES51/03 (AY955305), ES51/02 (AY955304), EC2184 (GQ149094), NB150/97 (DQ299877), HST034/98 (DQ525196), COD055/91 (DQ525192), LL4260 (EF159568), VN846/2003 (EF179117), KH210 (AB271687), KH228(AB271688), VN904/2003 (EF179118), LL36755 (EF159569), LL3354 (EF159567), 134/04-10 (AY955299), 134/04-11 (AY955300), 128/07-34 (EU734175), 134/04-8 (AY955301), 221/04-7 (AY955303), 221/04-13 (AY955302), Arg4605 (FJ712690), Arg4671 (FJ712691), 221/04-19 (AY955307), 221/04-20 (AY955308), 221/04-21 (AY955309), 134/04-7 (AY955310), BP1227/02 (AJ621505), SI-MB6 (EU348716), SI-P83(EU348718), SI-P14-3 (EU348717), BP1231/02 (AJ621506), BP720/93 (AJ621503), BP1198/98 (AJ621504), BP1338/00 (AJ621507), BP271/00 (AJ621502), JP3-6 (AB176685), JP29-6 (AB176688), Gottfried (M33516), Mc345 (D38054)-ouígroup.....	75
---	----

APÊNDICES	76
APÊNDICE A –Lista de reagentes.....	77
APÊNDICE B – Soluções e tampões	79
APÊNDICE C – Protocolo de técnicas	83

1 REVISÃO DE LITERATURA

INTRODUÇÃO

Diversas doenças podem acometer os suínos, porém as infecções entéricas ocasionam consideráveis prejuízos econômicos para a suinocultura. Independente dos níveis de tecnificação da criação, as diarreias neonatais representam importante problema sanitário em rebanhos suínos de todo o mundo. Devido às altas taxas de morbidade e mortalidade, os prejuízos determinados pelos episódios de diarreia, podem comprometer a exploração econômica dos suínos (PAUL; LYOO, 1993).

Em leitões, a diarreia neonatal determina alterações consideráveis nas taxas de conversão alimentar e ganho de peso, ocasionando desuniformidade das leitegadas ao desmame com consequentes problemas de manejo. Os gastos adicionais com manejo, imunoprofilaxia e tratamento de animais doentes, bem como as eventuais mortes de animais, contribuem para o aumento no custo de produção (SILVA et al., 1998).

A síndrome diarreia ocorre tanto em animais lactentes quanto recém-desmamados, comprometendo a saúde dos leitões nas fases de maternidade e creche. A falha na proteção passiva, principalmente em leitões provenientes de matrizes primíparas e o sistema imunológico imaturo do recém-nascido, representam as principais causas da maior susceptibilidade dos animais lactentes às infecções entéricas (ALFIERI et al., 1999a; KATSUDA et al., 2006). Devido às alterações alimentares e de ordem social, as duas primeiras semanas pós-desmame também são consideradas períodos críticos para o desenvolvimento de episódios de diarreia.

A diarreia neonatal em suínos é caracterizada como uma síndrome multifatorial e multietiológica. Fatores nutricionais e fisiológicos, manejo, alterações ambientais, imunidade do hospedeiro e agentes infecciosos podem estar envolvidos tanto no desenvolvimento quanto na intensidade de diarreia. Na etiologia das infecções incluem-se protozoários (*Criptosporidium* spp, *Isospora suis*, *Eimeria* sp.), bactérias (*Escherichia coli* enterotoxigênica, *Salmonella* spp.,

Clostridium perfringens tipo C) e vírus (rotavírus, coronavírus, calicivírus) (GREGORI et al., 2004; KATSUDA et al., 2006).

ROTAVÍRUS

Dentre os episódios diarreicos de etiologia viral destacam-se os ocasionados pelo rotavírus, que é um gênero da família *Reoviridae*. O vírion, desprovido de envelope lipoprotéico, tem aproximadamente 70-90 nm de diâmetro e é constituído por 11 segmentos de RNA de fita dupla (dsRNA), circundado por três camadas protéicas concêntricas de simetria icosaédrica, que constituem os capsídeos externo, intermediário e interno (ESTES; KAPIKIAN, 2007).

Cada segmento genômico do rotavírus codifica uma proteína viral, exceto o segmento onze que codifica duas proteínas, totalizando seis proteínas estruturais, denominadas VP (*viral protein*), e seis proteínas não-estruturais, denominadas NSP (*non-structural protein*). No capsídeo interno, também denominado de *core* ou núcleo viral, estão dispostas as proteínas VP1, VP3 e VP2, sendo que as duas primeiras estão intimamente associadas ao genoma viral. O capsídeo intermediário é formado pela proteína VP6 e o externo pelas proteínas VP4 e VP7. As proteínas não-estruturais do rotavírus são denominadas NSP1 a NSP6 (Figura 1) (PATTON, 1995; ESTES; KAPIKIAN, 2007).

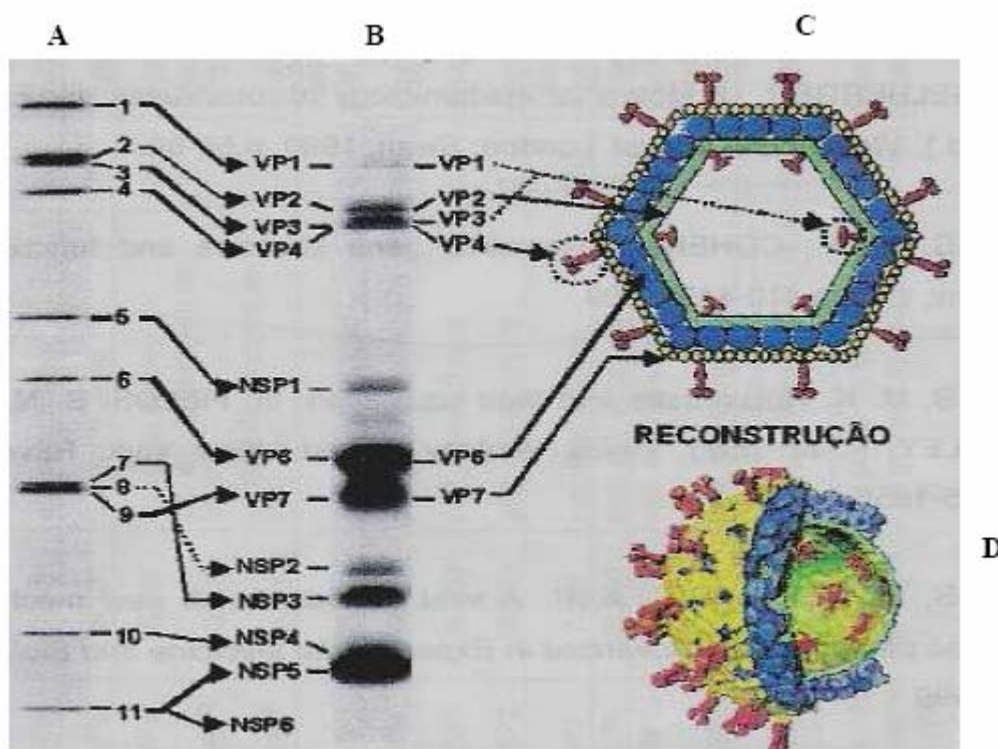


Figura 1 – Eletroforese em gel de poliacrilamida do genoma do rotavírus, RNA fita dupla, segmentado (A) e as proteínas codificadas por cada segmento genômico (B). Partícula de rotavírus representada esquematicamente (C); partícula de rotavírus e sua estrutura determinada por eletromicroscopia associada ao processamento de imagem por computador (D).

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

A proteína estrutural VP6, que forma o capsídeo intermediário, é a proteína mais abundante do vírion. De acordo com as características antigênicas desta proteína, os rotavírus são classificados em sete (A-G) sorogrupos distintos sendo que cada sorogrupo apresenta seu próprio antígeno comum (Estes e Kapikian, 2007). Dos sete sorogrupos dos rotavírus, apenas os grupos A, B e C determinam infecções que, por sua frequência, podem ser consideradas de importância epidemiológica para seres humanos e animais (Alfieri et al., 1999b; Rahman et al., 2007; Steyer et al., 2008; Médici et al., 2010). Os outros grupos (D-G) de rotavírus infectam apenas animais (Pedley et al., 1986; Devitt e Reynolds, 1993). Entretanto, a maioria das estirpes virais identificadas em seres humanos e animais com diarreia pertencem ao rotavírus sorogrupo A (RV-A).

ROTAVÍRUS SOROGRUPO A (RV-A)

Com base na diversidade antigênica das proteínas estruturais VP4 e VP7, localizadas na camada externa do capsídeo, ou dos segmentos genômicos que as codificam, é possível a caracterização das estirpes do RV-A em sorotipos ou genotipos. Com isso, de acordo com as características antigênicas da glicoproteína VP7 (G tipo) ou da proteína VP4 (P tipo), protease sensível, o RV-A é classificado por um sistema binário (KAPIKIAN; HOSHINO; CHANOCK, 2001). Pela ação da tripsina, ocorre clivagem proteolítica da VP4 entre os aminoácidos (aa), 241 e/ou 247, gerando dois pequenos polipeptídeos denominados VP5* e VP8*. Os diferentes genotipos P de RV-A exibem grande variação entre os aa 71-204. Ainda tem sido sugerido que a variação de sorotipos e subtipos possa ocorrer entre os aa 84-180. Desta maneira, a análise de nucleotídeos (nt) e de aa do fragmento VP8* é utilizada para determinar ou classificar os P tipos específicos de RV-A (LARRALDE et al., 1991; LARRALDE; GORZIGLIA, 1992). O fragmento VP5* é responsável por parte da reatividade cruzada entre as estirpes virais de diferentes sorotipos (LARRALDE et al., 1991).

Por meio de análise molecular das sequências dos genes VP4 e VP7, foram descritos até o momento 23 G tipos e 31 P tipos em estirpes de RV-A identificadas em seres humanos e em várias espécies de animais, incluindo mamíferos e aves (Anexo A) (PARRA; GALEANO; ARBIZA, 2007; ABE et al., 2009; SCHUMANN et al., 2009; SOLBERG et al., 2009; URSU et al., 2009). Essa diversidade de genotipos demonstra a extensa variabilidade antigênica e molecular desse sorogrupo de RV.

A proteína VP4, além de ser classificada em genotipos, de acordo com a especificidade antigênica também pode ser classificada em sorotipos. Até o momento foram descritos 14 sorotipos P (LIPRANDI et al., 2003).

As caracterizações sorotípica e genotípica das estirpes de rotavírus são importantes para definir a extensão da diversidade das estirpes virais circulantes em um determinado tempo e local. Além disso, comparações das estirpes de RV-A de origem humana e animal podem fornecer conhecimento sobre a evolução deste vírus entre as espécies animais (RÁCZ et al., 2000). A genotipagem, por meio de estudos moleculares, foi considerada a forma mais fácil e eficaz para a definição dos sorotipos/genotipos dos RV-A, principalmente por

apresentar boa correlação com a especificidade antigênica, utilizar reagentes sintéticos universais, possibilitar a análise de um grande número de amostras simultaneamente, além de demonstrar boa sensibilidade e especificidade (GOUVEA et al., 1990; WINIARCZYK et al., 2002). Existem alguns oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) comumente utilizados para detectar G e P tipos em RV-A provenientes de humanos e animais pela técnica de multiplex-*nested*-PCR.

Em algumas situações observa-se dificuldade ou mesmo impossibilidade de identificar os genótipos de RV-A por meio da genotipagem destacando-se entre elas: i) a diversidade de genótipos G e P de RV-A descritos em diferentes espécies animais não contemplados pelos *primers* utilizados; ii) o acúmulo de mutações pontuais no sítio de ligação dos *primers* dos genes VP4 e VP7; iii) a ocorrência cada vez maior de infecções mistas; iv) as variações gênicas decorrentes de mutações, recombinações e rearranjos genéticos; e v) a presença de inibidores da RT-PCR nas amostras de fezes. Estes fatores fazem com que a técnica de genotipagem por RT-PCR com utilização de *primers* específicos, seja acompanhada pelo sequenciamento e análise de nt e dos resíduos de aa. Em casos de infecções mistas a clonagem é utilizada como uma ferramenta adicional (MASCARENHAS et al., 2007a).

Considerando a complexidade dos sistemas utilizados atualmente para a classificação das estirpes de RV-A identificadas em infecções em seres humanos e animais recentemente, alguns trabalhos têm seguido novas estratégias para classificação dos RV-A. O sequenciamento e a caracterização do genoma completo (11 proteínas, estruturais e não-estruturais) da estirpe viral em estudo são as alternativas mais viáveis para a classificação de novas estirpes virais (MATTHIJNSSENS et al., 2008). Essa estratégia é interessante principalmente devido à grande diversidade antigênica observada em estirpes de RV-A proveniente de diferentes espécies de hospedeiros e também devido à possibilidade da ocorrência de *reassortments* (MATTHIJNSSENS et al., 2008; TSUGAWA; HOSHINO, 2008; MUKHERJEE et al., 2009).

RV-A SUÍNO (PoRV-A)

Dentre os vários genótipos G (VP7) e P (VP4) de RV-A descritos, os G tipos frequentemente identificados em infecções entéricas em suínos são o G3, G4, G5 e G11, associados com P[6] e P[7], que são considerados os P tipos mais comuns nessa espécie animal.

As combinações mais frequentes de G e P tipos em estirpes de RV-A de origem suína são: G5P[7] (OSU); G4P[6] (Gottfried); G11P[7] (YM) e G3P[7] (CRW8) (NAGESHA; HOLMES, 1988; RUIZ et al., 1988; CIARLET et al., 1994; GOUVEA; SANTOS; TIMENETSKY, 1994a; WINIARCZYK et al., 2002; BARREIROS et al., 2003). Outros P tipos como P[13], P[19], P[23], P[26] e P[27] também são descritos como genótipos já encontrados em suínos (HUANG et al., 1993; BURKE et al., 1994; LIPRANDI et al., 2003; MARTELLA et al., 2006b, 2007; KHAMRIN et al., 2007; STEYER et al., 2007).

Os rotavírus são considerados espécie-específicos, entretanto, infecções heterólogas são relatadas com certa frequência. As infecções heterólogas são originadas quando uma estirpe de rotavírus, característica de um determinado hospedeiro, infecta outra espécie animal. Alguns genótipos G1, G2, G9, G12 e P[6] (estirpes M37-Me) e P[8], normalmente encontrados em humanos, assim como em bovinos (G6, G8, G10, P[1], P[5] e P[11]) também têm sido descritos em suínos (CIARLET; LIPRANDI, 1994; GOUVEA; SANTOS; TIMENETSKY, 1994a,b; PONGSUWANNA et al., 1996; SANTOS et al., 1999; MARTELLA et al., 2001, 2005, 2006a; GHOSH et al., 2006). Considerando a ocorrência de infecções heterólogas, os suínos podem ser considerados reservatórios de estirpes de RV-A para os humanos e até mesmo para outras espécies animais, se estes forem infectados com uma estirpe que seja bem adaptada nas duas espécies.

RV-A GENOTIPO P[6]

A estirpe de rotavírus suíno grupo A (PoRV-A) Gottfried (G4P[6]), foi originalmente obtida do conteúdo intestinal de um suíno lactente com sinal clínico de diarreia e isolada em cultivo celular. Por esta estirpe viral apresentar-se antígenicamente distinta da estirpe suína OSU (sorotipo 1) (G5P[7]) foi considerada como um protótipo para o PoRV-A sorotipo 2 (BOHL; THEIL; SAIF, 1984). Posteriormente, por meio da análise da sequência de aa verificou-se que o gene VP4 da amostra Gottfried é geneticamente mais semelhante ao gene VP4 das estirpes P[6] humanas isoladas de crianças que apresentaram infecção assintomática do que com qualquer outra estirpe de rotavírus de origem humana ou animal. Estudos sugerem uma origem

comum entre a estirpe suína Gottfried e as estirpes de RV-A P[6] isoladas de infecções assintomáticas em seres humanos. É provável que a estirpe Gottfried possa ser o resultado de uma recombinação entre estirpes de RV-A de origem humana e suína que ocorreu de forma natural, ou pode representar uma estirpe viral de origem humana que se adaptou muito bem ao hospedeiro suíno (KANG; SAIF; MILLER, 1989; GORZIGLIA et al., 1990).

O sorotipo P2 é constituído por estirpes de rotavírus humano grupo A (HuRV-A) genotipo P[6] isoladas de infecções com ou sem sinais clínicos e também pela estirpe Gottfried de PoRV-A P[6] de origem suína. Porém, apesar da semelhança entre si, estas estirpes virais pertencem a diferentes subtipos. As estirpes de origem humana pertencem ao subtipo P2A[6] e a estirpe suína ao subtipo P2B[6] (Quadro 1) (LI; GORZIGLIA, 1993).

Estirpe	Genotipo	Sorotipo	Subtipo	Origem
M37	G1P[6]	P2	P2A	Humana
1076	G2P[6]	P2	P2A	Humana
ST3	G4P[6]	P2	P2A	Humana
Gottfried	G4P[6]	P2	P2B	Suína
AU-19	G1P[6]	P2	P2C	Humana
JP29-6	G9P[6]	P2	P2C	Suína

Quadro 1 – Estirpes padrão de RV-A genotipo P[6] de origem humana e suína.

Número de acesso (GenBank): M37 (L20877), 1076 (M88480), ST3 (L33895), Gottfried (M33516), AU-19 (AB017917), JP29-6 (AB176688), ST3 (L33895).

A estirpe G4P[6] (Gottfried) é comumente detectada na espécie suína. Alfieri (1999) detectou este genotipo como sendo o segundo mais frequente em amostras fecais de suínos provenientes de diferentes estados brasileiros. Esta combinação também foi detectada por meio da utilização de RT-PCR com *primers* específicos em 19,3% (6/31) e em 6,8% (6/88) das amostras de fezes de suínos provenientes dos Estados Unidos e da Polónia, respectivamente (WINIARCZYK et al., 2002).

O genotipo P[6] pode ser detectado por três *primers*, o 3T-1, originalmente desenhado para a estirpe humana 1076 para identificar as estirpes HuRV-A *M37-like* P2A[6], o *primer* pGott e o SP6 desenhados com base na estirpe Gottfried de PoRV-A P2B[6] (GENTSCH et al., 1992; GOUVEA; SANTOS; TIMENETSKY, 1994a; WINIARCZYK et al., 2002).

O genotipo P[6] também já foi detectado em rebanhos suínos no Paraná, onde 50% (5/10) das amostras fecais diarreicas de leitões com 21 a 35 dias de idade apresentaram esse genotipo. Ainda neste estudo, foi possível identificar os genotipos P[6] como P[6] (*Gottfried-like*), uma vez que a metodologia da PCR utilizada permite a diferenciação do genotipo P[6] em seus dois subtipos P[6] (*M37-like*) e P[6] (*Gottfried-like*), relacionando com os sorotipos P2A (*M37-like*) de origem humana e P2B (*Gottfried-like*) de origem suína (SANTOS et al., 1999). Ráczy e colaboradores (2000), ao avaliarem amostras PoRV-A provenientes de suínos com 1 a 60 dias de idade, com ou sem diarreia, pertencentes aos três estados da região sul do Brasil, por meio de genotipagem pela RT-PCR detectaram a presença dos subtipos P[6] (*M37-like*) e P[6] (*Gottfried-like*), pela utilização dos *primers* 3T-1 e pGott respectivamente.

Na Argentina, um estudo realizado com amostras de fezes de suínos com até 45 dias de idade, com ou sem diarreia, demonstrou a presença de PoRV-A em 3,3% (30/906) das amostras, sendo que destas 87,5% (7/8) ao serem genotipadas foram caracterizadas como genotipo P[6] (PARRA et al., 2008). A partir da análise de 144 amostras de fezes de leitões com quadro clínico de diarreia provenientes de 10 municípios do estado de São Paulo obteve-se 24 (16,66%) amostras positivas para rotavírus por PAGE e 39 (27,08%) por ELISA. O genotipo P[6] isolado foi o mais (25,6%) detectado entre as amostras avaliadas. Esse genotipo também foi identificado em associação com outros genotipos como P[6]+P[7] (9,3%), P[1]+P[6] (4,65%) e P[1]+P[6]+P[7] (2,33%) (GREGORI et al., 2009).

O genotipo P[6] também é detectado em humanos, sendo considerado um dos três P tipos mais comuns associados com infecções nesta espécie (SANTOS; HOSHINO, 2005). Na Hungria, o genotipo P[6] foi identificado em associação com G9 em quatro crianças. No entanto, o estudo sugere que esta estirpe foi importada da Índia, devido à semelhança com as estirpes detectadas em crianças naquele país e, principalmente, devido ao relato de viagem recente de um familiar para a Índia (LÁSZLÓ et al., 2009). No Brasil, durante o período de 1986 a 2006, em 1561 amostras de fezes de crianças e adultos avaliadas o genotipo P[6] foi detectado em combinação com G1 (1%), G2 (1%) e G4 (3%). Foi ainda possível concluir que a distribuição

dos genótipos no Brasil, neste período, foi semelhante à distribuição global (GURGEL et al., 2008).

A estirpe AU19 foi a primeira estirpe isolada que possui padrão de migração eletroforético "super-shorf" comparado ao padrão normal de migração dos HuRV-A. Esta estirpe viral foi isolada de uma criança apresentando quadro clínico de diarreia grave por rotavírus, no Japão. Por meio de estudos de neutralização utilizando anticorpos monoclonais (MAbs), esta estirpe foi considerada como membro do sorotipo P2. No sorotipo P2 também são classificadas estirpes virais de origem humana e a estirpe suína Gottfried. Entretanto, analisando a árvore filogenética com representantes dos sorótipos P2[6], a estirpe AU19 posiciona-se entre os subtipos P2A[6] e P2B[6], demonstrando uma distância significativamente maior que a comumente observada entre indivíduos que pertencem ao mesmo subtipo. Desta maneira, apesar de pertencer ao sorotipo P2[6], a estirpe AU19 representa um novo subtipo, chamado de P2C[6] (Quadro 1) (NAKAGOMI et al., 1999).

Dois estirpes P[6] de origem suína JP3-6 e JP29-6, também descritas no Japão, demonstraram identidade de 79 a 82% de nt e 84 a 86% de aa com as estirpes sorotipo P2 Gottfried e M37 de origem suína e humana, respectivamente. Ao realizar uma comparação entre as sequências dos fragmentos do gene VP8* das estirpes JP3-6 e JP29-6 (501-nt, 166-aa) com os dois subtipos de origem humana P2A[6] (M37), P2C[6] (AU19) e com o subtipo de origem suína P2B[6] (Gottfried), estas estirpes de PoRV-A demonstraram identidade de 89% de nt e 89 a 90% de aa com o subtipo P2C[6], que é formado pela estirpe humana AU19. A árvore filogenética das sequências do gene VP8* das estirpes P[6] dos RV-A reforça a semelhança já observada na identidade de nt e aa, onde as estirpes JP3-6 e JP29-6 formaram um grupo juntamente com a estirpe AU19, também descrita no Japão. Este estudo sugere que o gene VP4 das estirpes descritas pode ser de origem humana ou que o gene VP4 da estirpe humana AU19 pode ser de origem suína, já que a similaridade com a estirpe humana é maior do que com o protótipo suíno. Ainda segundo os autores, a análise do fragmento VP8* dessas duas estirpes demonstra entre si identidade de 99,9% nt e 99,6% aa, sugerindo que ambas podem ter tido origem comum (TEODOROFF et al., 2005).

RV-A - LINHAGENS E SUBLINHAGENS GENÉTICAS DO GENOTIPO P[6]

Com base na comparação das sequências e na análise filogenética, as três estirpes protótipos pertencentes ao sorotipo P2 (M37-P2A[6]; Gottfried-P2B[6]; e AU19-P2C[6]), têm sido consideradas geneticamente como três linhagens distintas do genótipo P[6], nomeadas como linhagens I, II e III, respectivamente (NAKAGOMI et al., 1999; MARTELLA et al., 2006a). Posteriormente, duas novas linhagens P[6], geneticamente distintas das linhagens anteriormente descritas, foram identificadas em HuRV-A na Hungria, sendo nomeadas como linhagens IV e V, e são representadas pelas estirpes virais BP1198/98-like e BP720/93-like, respectivamente (Figura 2) (BÁNYAI et al., 2004). As linhagens das estirpes P[6] dos RV-A ainda podem ser classificadas em sublinhagens, sendo que até o momento a linhagem I apresenta seis sublinhagens (Ia-I_f) e a linhagem V apresenta duas sublinhagens (Va-Vb) (Figura 3) (MARTELLA et al., 2006a; MASCARENHAS et al., 2007a; STUPKA et al., 2009).

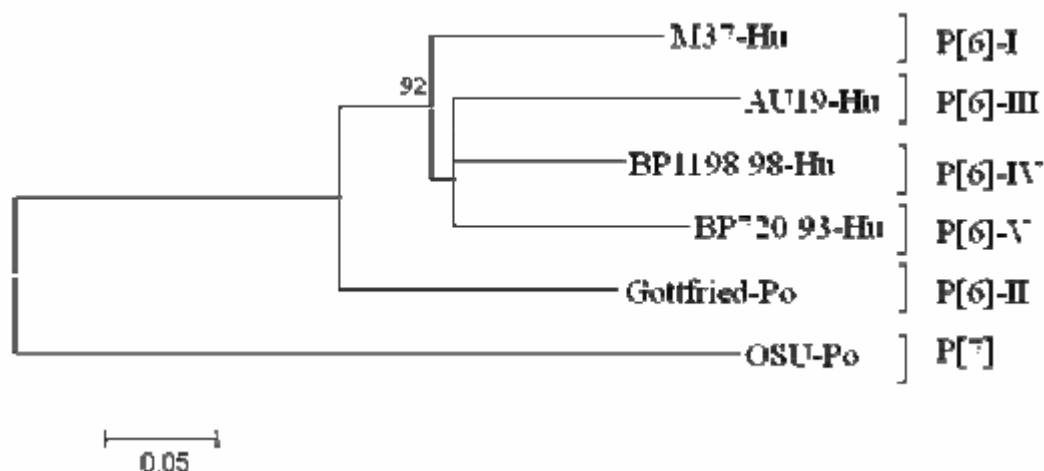


Figura 2 – Reconstrução da árvore filogenética baseada em sequências parciais com 505 nt (200-704 nt) do gene VP4 do RV-A pertencentes aos protótipos das linhagens do genótipo P[6], utilizando o método de *neighbor-joining* e o modelo de *Kimura two-parameter*. As sequências VP4 do RV-A (e seus números de acesso no *GenBank*) são as seguintes: M37 (L20877), Gottfried (M33516), AU19 (AB017917), BP1198/98 (AJ621504), BP720/93 (AJ621503), OSU (X13190)-outgroup. Abreviações: Hu, humano; Po, suíno.

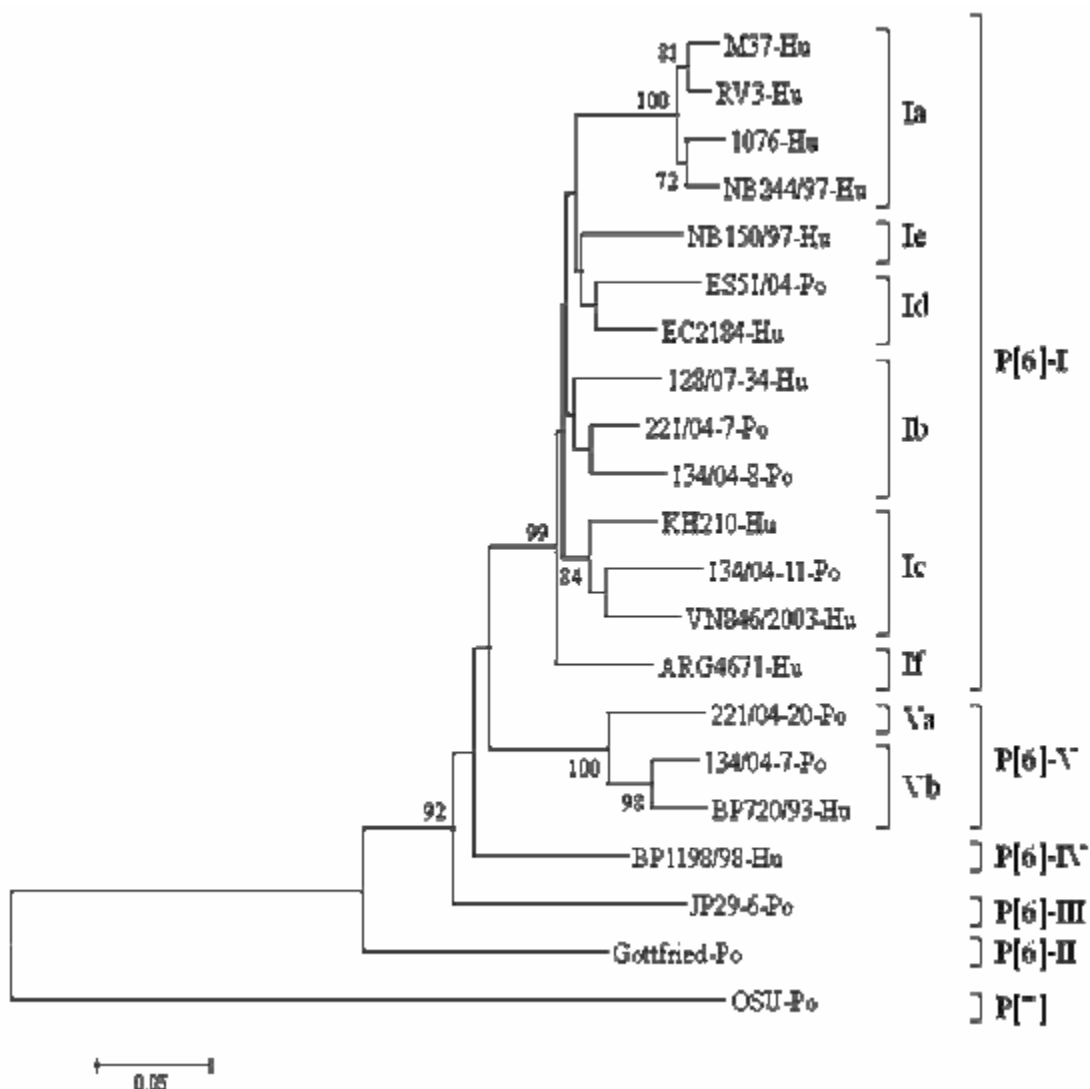


Figura 3 – Reconstrução da árvore filogenética baseada em sequências parciais com 587 nt (111-697 nt) do gene VP4 do RV-A pertencentes ao genótipo P[6], demonstrando a presença das linhagens e sublinhagens, utilizando o método de *neighbor-joining* e o modelo de *Kimura two-parameter*. As sequências parciais do gene VP4 do RV-A e os números de acesso no *GenBank* são os seguintes: M37 (L20877), RV3 (U16299), 1076 (M88480), NB244/97 (DQ822476), 128/07-34 (EU734175), 221/04-7 (AY955303), 134/04-8 (AY955301), VN846/2003 (EF179117), 134/04-11 (AY955300), KH210 (AB271687), ES51/04 (AY955306), EC2184 (GQ149094), NB150/97 (DQ299877), ARG4671 (FJ12691), Gottfried (M33516), JP29-6 (AB176688), BP1198/98 (AJ621504), 221/04-20 (AY955308), 134/04-7 (AY955310), BP720/93 (AJ621503), OSU (X13190)-outgroup. Abreviações: Hu, humano; Po, suíno.

Um estudo avaliou a relação entre estirpes de campo P[6] de PoRV-A com as estirpes protótipos de PoRV-A e HuRV-A. Das doze estirpes analisadas, nove eram provenientes

da Itália e três da Espanha. Com base na análise de nt e aa, estas estirpes agruparam-se em dois grupos distintos. No primeiro grupo oito estirpes virais agruparam-se com o protótipo humano da linhagem I (estirpe M37-like) e apresentaram 85,8 a 94,6% e 86 a 92,5% de identidade de aa e nt, respectivamente, com as estirpes virais humanas da linhagem I. Entretanto, as estirpes HuRV-A mantiveram-se distintas das PoRV-A, formando um ramo diferente na árvore filogenética, originando sublinhagens dentro da linhagem I, sendo que a estirpe humana M37-like representa a sublinhagem P[6]-Ia. Com base na disposição das estirpes em diferentes ramos da árvore filogenética, outras três sublinhagens (Ib, Ic e Id) foram propostas onde a sublinhagem P[6]-Ib, permanece mais próxima da sublinhagem Ia de HuRV-A, com identidade acima de 94,6% aa e 92,5% nt. No segundo grupo, as quatro estirpes de PoRV-A restantes agruparam-se com as estirpes virais humanas da linhagem V, que são representadas pelo protótipo BP720/93-like. As estirpes PoRV-A exibiram identidade de 93,2 a 97% aa e 91,8 a 96,1% nt com as estirpes de HuRV-A da linhagem V. Das doze estirpes PoRV-A analisadas, nenhuma foi considerada semelhante à estirpe viral suína Gottfried, que é o protótipo da linhagem II. As estirpes descritas exibiram 82,8 a 85,1% e 80,7 a 82,2% de identidade de aa e nt, com a estirpe suína (MARTELLA et al., 2006a).

No Brasil, um estudo proporcionou a detecção de uma estirpe de RV-A apresentando tanto origem humana quanto animal. Esta estirpe foi obtida de um neonato da cidade de Belém/PA, região Norte do Brasil. As análises das proteínas VP7 e VP6 da estirpe denominada NB-150 revelaram a origem humana das mesmas. A proteína VP7 demonstrou identidade 96,9 - 100% aa com o genótipo G1 e 97,1 - 100% aa com o genótipo G4, revelando desta forma, a presença de dois alelos da proteína VP7 nesta estirpe. A proteína VP6 exibiu identidade 95,1 - 97,5% aa com as estirpes de origem humana. Entretanto, as sequências dos genes VP8* e NSP4 exibiram 95% e 93,7 - 96% de identidade de aa, respectivamente, com as estirpes virais de origem suína. Esta estirpe, ao ser comparada com outras estirpes genótipo P[6] já descritas, agrupou-se na linhagem I, apresentando 95% de identidade de aa com a sublinhagem Ib suína. No entanto, apesar da identidade com a sublinhagem Ib, esta estirpe de HuRV-A deu origem a um novo ramo na árvore filogenética e, conseqüentemente, uma nova sublinhagem, denominada de P[6]-Ie (MASCARENHAS et al., 2007a). Este achado sustenta a hipótese de transmissão interespecie envolvendo humanos e suínos.

Ainda no Brasil, outro estudo caracterizou 27 estirpes P[6] de HuRV-A isoladas de neonatos e crianças. Das 27 estirpes, 26 formaram um grupo com a linhagem I, onde 19 agruparam-se na sublinhagem humana Ia com 90,7 - 98,8% de identidade de aa. As demais sete estirpes virais formaram um grupo distinto dos já existentes, apesar de exibirem 89,2 - 98,1% de identidade de aa com estirpes suínas das sublinhagens Ib e Ic, sendo que também pertence a este grupo a estirpe NB-150, que originou a sublinhagem Ie. Outra estirpe não foi agrupada com nenhuma das linhagens já descritas, demonstrando 90%, 88%, 88%, 83% e 85% de identidade de aa com as linhagens IV, V, I, II e III, respectivamente. Com relação à proteína NSP4, 29,6% (8/27) das estirpes foram classificadas como genótipo B, apresentando maior semelhança com o protótipo suíno (MASCARENHAS et al., 2007a; MASCARENHAS et al., 2007b).

Na Argentina, foram descritas duas estirpes contendo o genótipo G4P[6] representando 0,4% (2/464) dos HuRV-A analisados. A análise do fragmento VP8* do gene VP4 revelou que estas duas estirpes virais apresentavam 92,8% e 96,7% de identidade de nt e aa com as estirpes de PoRV-A pertencentes a sublinhagem Ib. Os genes VP7 e NSP4 também foram analisados confirmando a origem suína destas estirpes. A análise da árvore filogenética possibilitou observar que as estirpes pertencem à linhagem P[6]-I, porém, dão origem a um ramo distinto na linhagem I, sendo consideradas uma nova sublinhagem denominada P[6]-If (STUPKA et al., 2009).

Por meio de análise molecular das estirpes de rotavírus genótipo P[6] descritas em humanos e animais, foi possível demonstrar que das cinco linhagens P[6] identificadas até o presente momento, as linhagens I, III e V, são formadas por estirpes de origem humana e suína; a linhagem II apenas pela estirpe suína Gottfried; e a linhagem IV por estirpes de RV-A de origem humana (MARTELLA et al., 2006a).

RELAÇÃO ENTRE PORV-A E HURV-A

Atualmente, diversos estudos suportam ou reforçam a hipótese de que há uma interação dinâmica entre estirpes de RV-A identificadas em seres humanos e em animais e que *reassortments* podem resultar na introdução de genes alelos em rotavírus humanos. Evidências

para *reassortment* genético entre estirpes de RV-A de origem humana ou animal têm sido obtidas, particularmente com as espécies bovina e suína que, em comparação com outras espécies animais, apresentam íntimo contato com a espécie humana (MARTELLA et al., 2006a; MARTELLA et al., 2008; STEYER et al., 2008; MUKHERJEE et al., 2009).

Uma rara estirpe G5P[6] foi isolada de uma criança chinesa de 18 meses de idade apresentando padrão eletroforético semelhante à estirpe Wa de HuRV-A. Por meio de análise do gene VP7 esta estirpe, denominada de LL36755, apresentou identidade de 88,6 a 89,9% de nt e 92,6 a 95,4% de aa com as estirpes virais do genotipo G5. A análise parcial da sequência de aminoácidos do gene VP4 (290 aa) revelou identidade de 83,2 a 94,5% com as estirpes pertencentes ao genotipo P[6]. Dentro do genotipo P[6] a estirpe LL36755 apresentou identidade de 93% de nt e 94,5% de aa com as estirpes P[6] de origem suína (134/04-10, 134/04-11, 221/04-7 e 221/04-13), identificadas na Itália. A árvore filogenética confirmou os dados da matriz de identidade já que a estirpe viral de origem humana agrupou-se juntamente com as estirpes suínas. Devido à grande similaridade dos genes VP7 e VP4 das estirpes de origem humana e animal, os autores sugerem que as estirpes humanas incomuns podem ter evoluído gradualmente a partir de outras estirpes virais de origem humana e suína. A detecção desta estirpe de rotavírus fortalece a hipótese de interação entre RV-A de origem humana e animal (DUAN et al., 2007).

Outro estudo conduzido na China caracterizou as proteínas VP4, VP6, VP7 e NSP4 das estirpes LL36755, LL3354 e LL4260 detectadas em crianças, apresentando a combinação G5P[6]. Por meio de análise dos aa observou-se que os genes VP4 e VP7 destas três estirpes virais apresentavam origem suína. O gene VP4 demonstrou identidade de aa de 92,5 a 96,3% com as estirpes suínas ES51-02, 134/04-10, 134/04-11, 221/04-7 e 221/04-13. No entanto, a proteína NSP4 demonstrou ser de origem humana. Com relação à proteína VP6, as estirpes LL3354 e LL36755 tiveram maior identidade de aa com as estirpes do grupo SGI (subtipo I) e SGII (subtipo II), respectivamente. Já a sequência de aa da outra estirpe continha características de ambos os grupos, promovendo a formação de um grupo atípico dentro do SGI na árvore filogenética. Os autores indicam uma interação entre rotavírus de origem humana e animal e sugerem que o *reassortment* poderia resultar numa introdução estável e com expansão bem sucedida de genes de origem suína em HuRV-A (LI et al., 2008).

Estudos realizados na Itália também relatam a detecção de uma estirpe G3P[6], em uma criança hospitalizada com gastroenterite aguda. Esta combinação é incomum em humanos, uma vez que, nessa espécie, o genotipo G3 geralmente está associado ao genotipo P[8]. A análise da sequência de aa desta estirpe revelou a presença de VP6 e NSP4 de origem humana, porém VP4 e VP8* de origem suína. Este estudo também evidencia a ocorrência de infecção heteróloga que pode ser de origem suína ou por um *reassortment* natural suíno-humano (MARTELLA et al., 2008).

Um estudo realizado na Eslovênia analisou, paralelamente, amostras de RV-A de origem humana, suína e bovina. Foi identificada a presença do genotipo P[6] em 0,4% (1/241) das amostras de HuRV-A e em 40,7% (33/81) das amostras de PoRV-A. As combinações observadas em PoRV-A foram G3P[6] (15/33), G4P[6] (10/33) e G5P[6] (10/33). O genotipo G3P[6] foi o mais identificado em amostras provenientes de suínos e esteve presente em uma única amostra de origem humana, denominada SI-MB6. Ao comparar as sequências do gene VP8* da estirpe SI-MB6 com estirpes P[6] de HuRV-A e PoRV-A, observou-se identidade de 93,7% nt e 95% aa com as estirpes virais da linhagem V. Na árvore filogenética observa-se que a estirpe de HuRV-A SI-MB6 forma um grupo com estirpes P[6] de origem suína, separado das estirpes virais de origem humana. Outros três genes analisados (VP7, VP6 e NSP4) também demonstraram que esta estirpe apresenta maior identidade de nt e aa com as estirpes virais de origem suína. Como a estirpe SI-MB6 apresentou maior identidade com estirpes de origem suína nos quatro genes analisados, os autores propõem que esta estirpe de HuRV-A possa ser o resultado da transmissão zoonótica do rotavírus de um suíno para o ser humano (STEYER et al., 2008).

Na Índia, foi analisado o genoma completo da estirpe de HuRV-A G9P[6], denominada de mcs/13-07. O gene VP8* desta estirpe apresentou máxima identidade de aa com estirpes de origem suína e na árvore filogenética esta estirpe de HuRV-A agrupou-se com as estirpes virais da sublinhagem Id. Outros genes (VP1-3, NSP1-3, NSP5 e VP7) também apresentam maior identidade com as estirpes virais de origem suína e VP6 e NSP4 agruparam-se com estirpes virais de origem humana. Porém, a análise global demonstrou que a estirpe mcs/13-07 de HuRV-A apresentou >80-90% de identidade de nt tanto com estirpes virais consideradas *Wa-like*, de origem humana, quanto com estirpes *Gottfried-like*, de origem suína. Os autores sugerem que esta estirpe de HuRV-A tenha sido transmitida como um vírus completo do suíno

para o ser humano e evoluído com o tempo ou que esta estirpe tenha sofrido vários eventos de *reassortment* envolvendo estirpes humanas *Wa-like* e suínas P[6]-Id (MUKHERJEE et al., 2009).

Diversos estudos sustentam a hipótese de transmissão interespecie do hospedeiro suíno para os humanos, porém o inverso também pode estar acontecendo. Estudar as estirpes de RV-A identificadas simultaneamente em humanos e animais é essencial para a melhor compreensão da relação entre as estirpes virais circulantes, sejam elas combinações de G e P tipos comuns ou atípicos.

VACINAS E VACINAÇÃO

A imunidade determinada pelo rotavírus, por meio de infecção natural ou de antígenos presentes nas vacinas comerciais, é predominantemente homotípica, ou seja, atua contra infecções por sorotipos homólogos de rotavírus para os quais os animais foram expostos anteriormente (OLIVEIRA et al., 1994). Entretanto, tem sido demonstrado que a infecção natural ou mesmo a vacinação por um sorotipo específico, pode promover a imunidade heterotípica atuando, desta forma, em genotipos distintos daqueles presentes na vacina ou que causaram a infecção. No entanto, estudos mais abrangentes devem ser conduzidos com o objetivo de consolidar esses achados (BERNSTEIN et al., 2002; RUIZ-PALACIOS et al., 2006).

Desta maneira, pode-se dizer que a resposta imunológica à primoinfecção é homotípica e que a resposta às infecções subsequentes é mais ampla, com produção de anticorpos heterotípicos (VELAZQUEZ et al., 1996).

Em 2006 foram liberadas duas vacinas atenuadas e de uso oral para a profilaxia da rotavirose em crianças. A *Rotarix*TM (*GlaxoSmithKline - GSK Biologicals* - Bélgica) é uma vacina monovalente que utiliza HuRV-A sorotipo humano G1P1A[8]. A *RotaTeq*TM (*Merck & Co., Inc., EUA*) é uma vacina recombinante pentavalente que utiliza uma estirpe viral de origem bovina com genes de HuRV-A para expressar os sorotipos G1, G2, G3, G4 e P1A[8]. A vacina *Rotarix*TM é administrada em duas doses com um intervalo de quatro semanas em crianças com 6 a 24 semanas de idade. Com relação à *RotaTeq*TM, são utilizadas três doses entre 6 - 32 semanas de idade, com exceção da Europa onde as doses são administradas entre 6 - 24 semanas de idade

(AVANT Immunotherapeutics/GlaxoSmithKline, 2004; HEATON et al., 2005; VESIKARI, 2008).

O Brasil foi o primeiro país da América Latina a introduzir um programa nacional de imunização contra a rotavirose humana utilizando a vacina *Rotarix*TM. O uso da vacinação no Brasil diminuiu, consideravelmente, a ocorrência de diarreia em crianças no país e, conseqüentemente, a caracterização dos genótipos das estirpes de HuRV-A. Além disso, a detecção dos genótipos foi diferenciada após a introdução do programa de vacinação (GURGEL et al., 2008; CARVALHO-COSTA et al., 2009).

Além do Brasil, a eficácia da vacina *Rotarix*TM também foi constatada em outros 10 países da América do Sul e na Finlândia, demonstrando 84,7% de eficácia contra gastroenterite grave e diminuindo 85% das hospitalizações (RUIZ-PALACIOS et al., 2006). A eficácia da vacina *Rotarix*TM nos casos de gastroenterite grave causada pela estirpe G1P[8] homóloga da vacina e pelas estirpes G3P[8], G4P[8] e G9P[8], que apresentam o genótipo P[8] presente na vacina e pela estirpe G2P[4] desprovida dos genótipos vacinais, foi de 90,8%, 87,3% e 41%, respectivamente (RUIZ-PALACIOS et al., 2006).

A imunidade ainda pode variar de acordo com os sorótipos que induziram a infecção. Em crianças, o sorótipo G1 geralmente induz reação homotípica. Os sorótipos G2 e G4, por sua vez, além de induzirem anticorpos homólogos também estimulam a síntese de anticorpos heterólogos para o tipo G1. Essas evidências demonstram que a indução de resposta imune heteróloga, provavelmente, constitui uma propriedade intrínseca da estirpe viral (ARIAS et al., 1994).

Para o controle e profilaxia da diarreia neonatal bovina são disponíveis no mercado nacional de produtos biológicos duas vacinas. A Rotatec J5TM (Biogenesis Brasil) é composta pelos sorótipos G6 e G10, além de bacterina e toxóide da *Escherichia coli* J5 (cepa O111:B4). As novilhas e vacas não vacinadas devem receber duas doses da vacina sendo 60 e 30 dias antes do parto. As vacas vacinadas devem receber apenas uma dose 30 dias antes do parto (Biogenesis Bago, 2009). A outra vacina utilizada em bovinos no Brasil é a *ScourGuard*[®] 4KC (Pfizer Animal Health, EUA) que também contém os sorótipos G6 e G10 do RV-A, além do coronavírus bovino, antígeno fimbrial K99 de *Escherichia coli* e o *Clostridium perfringens* tipo C (PFIZER, 2009).

Em bovinos, a vacina monovalente G6P[1] induz anticorpos homotípicos que são transferidos passivamente aos bezerros pela ingestão do colostro. Entretanto, a imunidade heterotípica pode ser comprometida, já que bezerros provenientes de vacas vacinadas podem apresentar episódios de diarreia causados por estirpes RV-A de genótipos diferentes da vacina (BARREIROS et al., 2004).

Em suínos, no Brasil, é comercializada a vacina *Porcilis 2*4*3** (Intervet - Schering Plough Animal Health, EUA), que contém os sorotipos G4 e G5 atenuados, além do toxóide do *Clostridium perfringens* tipo C e os antígenos fimbriais K88, K99, 987P e F41 da *Escherichia coli*. As marrãs devem receber duas doses da vacina com intervalo de três semanas, aos 80 e 100 dias de gestação. As porcas devem receber apenas uma dose entre 90-100 dias de gestação.

Diferentes genótipos de RV-A ou novas variantes de um genótipo específico ou ainda a reemergência de alguns genótipos que foram previamente controlados pela vacina podem emergir ou difundir-se na população em condições adequadas. A pressão imune induzida pela vacinação em massa pode ser responsável por promover *reassortment*, rearranjo e transmissão zoonótica entre animais e humanos (MATTHIJNSSENS et al., 2009).

Para a adoção de um programa de vacinação eficaz deve ser considerada a provável variação antigênica/molecular das estirpes virais presentes em uma região ou mesmo período de tempo definido. Após a introdução da vacina é fundamental monitorar as estirpes circulantes para, futuramente, se for necessário, incluir os novos sorotipos na vacina. A pressão vacinal pode induzir a seleção de novas estirpes de rotavírus e, desta forma, torna-se importante o constante monitoramento da emergência e/ou reemergência de novas estirpes virais, além das infecções heterólogas, rearranjos e *reassortments*.

REFERÊNCIAS

ABE, M.; 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, p.250-257, 2009.

ALFIERI, A.A.; ALFIERI, A.F.; BEUTTEMMÜLLER, E.A.; BRITO, B.G.; MÉDICI, K.C. Aspectos epidemiológicos da rotavirose suína na região sudoeste do estado do Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**, v.20, n.1, p.5-11, 1999a.

ALFIERI, A.A.; LEITE, J.P.G.; ALFIERI, A.F.; JIANG, B.; GLASS, R.I.; GENTSCH, J.R. Detection of field isolates of human and animal group C rotavirus by reverse transcription-polymerase chain reaction and digoxigenin-labeled oligonucleotide probes. **Journal of Virological Methods**, v.83, p.35-43, 1999b.

ALFIERI, A.F. Caracterização dos genótipos P e G de rotavírus do grupo A de origem animal (bovina e suína) e de origem humana pela reação em cadeia pela polimerase. **Tese** (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Brazil, 134), 1999.

ARIAS, C.F.; LOPEZ, S.; MASCARENHAS, J.D.P.; ROMERO, P.; CANO, P.; GABBAY, Y.B.; DE FREITAS, R.B.; LINHARES, A.C. Neutralizing antibody immune response in children with primary and secondary rotavirus infections. **Clinical Diagnostic Laboratory Immunology**, v.1, n.1, p.89-94, 1994.

AVANT Immunotherapeutics/GlaxoSmithKline Inc. Rotavirus Vaccine. **Drugs in R&D**, v.5, n.2, p.113-115, 2004.

BÁNYAI, K.; MARTELLA, V.; JAKAB, F.; MELEGH, B.; SZUCS, G. Sequencing and Phylogenetic Analysis of Human Genotype P[6]Rotavirus Strains Detected in Hungary Provides Evidence for Genetic Heterogeneity within the P[6] VP4 Gene. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, n.9, p. 4338-4343, 2004.

BARREIROS, M.A.B.; ALFIERI, A.A.; ALFIERI, A.F.; MÉDICI, K.C.; LEITE, J.P.G. An outbreak of diarrhoea in one-week-old piglets caused by group A rotavirus genotypes P[7],G3 and P[7],G5. **Veterinary Research Communications**, v.27, p.505-512, 2003.

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 B**, v.51, p.104-109, 2004.

BERNSTEIN, D.I.; SACK, D.A.; REISINGER, K.; ROTHSTEIN, E.; WARD, R.L. Second-year follow-up evaluation of live, attenuated human rotavirus vaccine 89-12 in healthy infants. **The Journal of Infectious Diseases**, v.186, p.1487-1489, 2002.

BIOGENESIS BAGO.<http://www.biogenesisbago.com/brasil/produto_int.php?id=32> Acesso em: 16 de Janeiro de 2009.

BOHL, E.H.; THEIL, K.W.; SAIF, L.J. Isolation and Serotyping of Porcine Rotaviruses and Antigenic Comparison with Other Rotaviruses. **Journal of Clinical Microbiology**, v.19, n.2, p.105-111, 1984.

BURKE, B.; MCCRAE, M.A.; DESSELBERGER, U. Sequence analysis of two porcine rotaviruses differing in growth *in vitro* and in pathogenicity: distinct VP4 sequences and conservation of NS53, VP6 and VP7 genes. **Journal of General Virology**, v.75, p. 2205-2212, 1994.

CARVALHO-COSTA, F.A.; ARAÚJO, I.T.; ASSIS, R.M.; FIALHO, A.M.; MARTINS, C.M.M.A.; BÓIA, M.N.; LEITE, J.P.G. Rotavirus genotype distribution after vaccine introduction, Rio de Janeiro, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v.15, n.1, p.95-97, 2009.

CIARLET, M.; HIDALGO, M.; GORZIGLIA, M.; LIPRANDI, F. Characterization of neutralization epitopes on the VP7 surface protein of serotype G11 porcine rotaviruses. **Journal of General Virology**, v.75, p.1867-1873, 1994.

CIARLET, M.; LIPRANDI, F. Serological and Genomic Characterization of Two Porcine Rotaviruses with Serotype G1 Specificity. **Journal of Clinical Microbiology**, v.32, n.1, p.269-272, 1994.

DEVITT, C.M.; REYNOLDS, D.L. Characterization of a Group D Rotavirus. **Avian diseases**, v.37, p.749-755, 1993.

DUAN, Z-J.; LI, D-D.; ZHANG, Q.; LIU, N.; HUANG, C-P.; JIANG, X.; JIANG, B.; GLASS, R.; STEELE, D.; TANG, J-Y.; WANG, Z-S.; FANG, Z-Y. Novel human rotavirus of genotype

G5P[6] identified in a stool specimen from a Chinese girl with diarrhea. **Journal of Clinical Microbiology**, v.45, n.5, p.1614-1617, 2007.

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

ESTES, M.K.; KAPIKIAN, A.Z. Rotaviruses. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (Ed.) **Fields Virology**. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p.1917-1974, 2007.

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, p.1365-1373, 1992.

GHOSH, S.; VARGHESE, V.; SAMAJDAR, S.; BHATTACHARYA, S. K.; KOBAYASHI, N.; NAIK, T. N. Molecular characterization of a porcine group A rotavirus strain with G12 genotype specificity. **Archives of Virology**, v.151, p.1329-1344, 2006.

GORZIGLIA, M.; NISHIKAWA, K.; HOSHINO, Y.; TANIGUCHI, K. Similarity of the Outer Capsid Protein VP4 of the Gottfried Strain of Porcine Rotavirus to That of Asymptomatic Human Rotavirus Strains. **Journal of Virology**, v.64, n.1, p.414-418, 1990.

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, p.276-282, 1990.

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

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

GREGORI, F.; RUIZ, V.L.A.; BERSANO, J.G.; CENTOFANTI, T. Divulgação técnica: Rotaviroses em criações de suínos. **Biológico**, v.66, n.1-2, p. 11-12, 2004.

GREGORI, F.; ROSALES, C.A.R.; BRANDÃO, P.E.; SOARES, R.M.; JEREZ, J.A. Diversidade genotípica de rotavirus suínos no Estado de São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.29, n.9, p.707-712, 2009.

GURGEL, R.Q.; CUNLIFFE, N.A.; NAKAGOMI, O.; CUEVAS, L.E. Rotavirus genotypes circulating in Brazil before national rotavirus vaccination: A review. **Journal of Clinical Virology**, v.43, p.1-8, 2008.

HEATON, P.M.; GOVEIA, M.G.; MILLER, J.M.; OFFIT, P.; CLARK, H.F. Development of a pentavalent rotavirus vaccine against prevalent serotypes of rotavirus gastroenteritis. **The Journal of Infectious Diseases**, v.192 (Suppl):S17-S21, 2005.

HUANG, J.; NAGESHA, H.S.; HOLMES, I.H. Comparative sequence analysis of VP4s from five australian porcine rotaviruses: implication of an apparent new P type. **Virology**, v.196, p.319-327, 1993.

KANG, S-Y.; SAIF, L.J.; MILLER, K.L. Reactivity of VP4-Specific Monoclonal Antibodies to a Serotype 4 Porcine Rotavirus with Distinct Serotypes of Human (Symptomatic and Asymptomatic) and Animal Rotaviruses. **Journal of Clinical Microbiology**, v.27, n.12, p.2744-2750, 1989.

KAPIKIAN, A.Z.; HOSHINO, Y.; CHANOCK, R.M. Rotaviruses. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (Ed.) **Fields Virology**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p.1787-1833, 2001.

KATSUDA, K.; KOHMOTO, M.; KAWASHIMA, K.; TSUNEMITSU, H. Frequency of enteropathogen detection in suckling and weaned pigs with diarrhea in Japan. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.18, p.350-354, 2006.

KHAMRIN, P.; MANEEKARN, N.; PEERAKOME, S.; CHAN-IT, W.; YAGYU, F.; OKITSU, S.; USHIJIMA, H. Novel porcine rotavirus of genotype P[27] shares new phylogenetic lineage with G2 porcine rotavirus strain. **Virology**, v.361, p.243-252, 2007.

LARRALDE, G.; LI, B.; 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.

LASZLO, B.; NYUL, Z.; KISFALI, P.; DEAK, J.; KOVACS, J.; KONYA, J.; MESZNER, Z.; MOLNAR, P.; PATRI, L.; SCHNEIDER, F.; TOTH, A.; MELEGH, B.; ITURRIZA-GOMARA, M.; GRAY, J.; MARTELLA, V.; SZUCS, G.; BANYAI, K. First Detection of P[6],G9

Rotaviruses in Hungary - An Imported Strain From India? **Journal of Travel Medicine**, v.16, n.2, p. 141-143, 2009.

LI, B.; GORZIGLIA, M. VP4 Serotype of the Gottfried Strain of Porcine Rotavirus. **Journal of Clinical Microbiology**, v.31, n.11, p.3075-3077, 1993.

LI, D-D.; DUAN, Z-J.; ZHANG, Q.; LIU, N.; XIE, Z-P.; JIANG, B.; STEELE, D.; JIANG, X.; WANG, Z-S.; FANG, Z-Y. Molecular characterization of unusual human G5P[6] rotaviruses identified in China. **Journal of Clinical Virology**, v.42, p.141-148, 2008.

LIPRANDI, F.; GERDER, M.; BASTIDAS, Z.; LOPEZ, J.A.; PUJOL, F.H.; LUDERT, J.E.; JOELSSON, D.B.; CIARLET, M. A novel type of VP4 carried by a porcine rotavirus strain. **Virology**, v.315, p.373-380, 2003.

MARTELLA, V.; PRATELLI, A.; GRECO, G.; TEMPESTA, M.; FERRARI, M.; LOSIO, M.N.; BUONAVOGLIA, C. Genomic characterization of porcine rotaviruses in Italy. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.8, n.1, p.129-132, 2001.

MARTELLA, V.; CIARLET, M.; BASELGA, R.; ARISTA, S.; ELIA, G.; LORUSSO, E.; BANYAI, K.; TERIO, V.; MADIO, A.; RUGGERI, F.M.; FALCONE, E.; CAMERO, M.; DECARO, N.; BUONAVOGLIA, C. Sequence analysis of the VP7 and VP4 genes identifies a novel VP7 gene allele of porcine rotaviruses, sharing a common evolutionary origin with human G2 rotaviruses. **Virology**, v.337, p.111-123, 2005.

MARTELLA, V.; BANYAI, K.; CIARLET, M.; ITURRIZA-GOMARA, M.; LORUSSO, E.; DE GRAZIA, S.; ARISTA, S.; DECARO, N.; ELIA, G.; CAVALLI, A.; CORRENTE, M.; LAVAZZA, A.; BASELGA, R.; BUONAVOGLIA, C. Relationships among porcine and human P[6] rotaviruses: evidence that the different human P[6] lineages have originated from multiple interspecies transmission events. **Virology**, v.344, p.509-519, 2006a.

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, p.301-311, 2006b.

MARTELLA, V.; CIARLET, M.; BANYAI, K.; LORUSSO, E.; ARISTA, S.; LAVAZZA, A.; PEZZOTTI, G.; DECARO, N.; CAVALLI, A.; LUCENTE, M.S.; CORRENTE, M.; ELIA, G.; CAMERO, M.; TEMPESTA, M.; BUONAVOGLIA, C. Identification of group A porcine

rotavirus strains bearing a novel VP4 (P) genotype in Italian swine herds. **Journal of Clinical Microbiology**, v.45, p.577-580, 2007.

MARTELLA, V.; COLOMBRITA, D.; LORUSSO, E.; DRAGHIN, E.; FIORENTINI, S.; DE GRAZIA, S.; BANYAI, K.; CIARLET, M.; CARUSO, A.; BUONAVOGLIA, C. Detection of a porcine-Me rotavirus in a child with enteritis in Italy. **Journal of Clinical Microbiology**, v.46, n.10, p.3501-3507, 2008.

MASCARENHAS, J.D.P.; LEITE, J.P.G.; LIMA, J.C.; HEINEMANN, M.B.; OLIVEIRA, D.S.; ARAÚJO, I.T.; SOARES, L.S.; GUSMÃO, R.H.P.; GABBAY, Y.B.; LINHARES, A.C. Detection of a neonatal human rotavirus strain with VP4 and NSP4 genes of porcine origin. **Journal of Medical Microbiology**, v.56, p.524-532, 2007a.

MASCARENHAS, J.D.P.; LINHARES, A.C.; GABBAY, Y.B.; LIMA, C.S.; GUERRA, S.F.S.; SOARES, L.S.; OLIVEIRA, D.S.; LIMA, J.C.; MACÊDO, O.; LEITE, J.P.G. Molecular characterization of VP4 and NSP4 genes from rotavirus strains infecting neonates and Young children in Belém, Brazil. **Virus Research**, v.126, p. 149-158, 2007b.

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, 2008.

MATTHIJNSSENS, J.; BILCKE, J.; CIARLET, M.; MARTELLA, V.; BÁNYAI, K.; RAHMAN, M.; ZELLER, M.; BEUTELS, P.; DAMME, P.V.; RANST, M.V. Rotavirus disease and vaccination: impact on genotype diversity. **Future Microbiology**, v.4, n.10, p.1303-1316, 2009.

MÉDICI, K.C.; BARRY, A.F.; ALFIERI, A.F.; ALFIERI, A.A. Genetic analysis of the porcine group B rotavirus NSP2 gene from wild-type Brazilian strains. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.43, p.13-16, 2010.

MUKHERJEE, A.; DUTTA, D.; GHOSH, S.; BAGCHI, P.; CHATTOPADHYAY, S.; NAGASHIMA, S.; KOBAYASHI, N.; DUTTA, P.; KRISHNAN, T.; NAIK, T.N.; CHAWLA-SARKAR, M. Full genomic analysis of a human group A rotavirus G9P[6] strain from Eastern India provides evidence for porcine-to-human interspecies transmission. **Archives of Virology**, v.154, p.733-746, 2009.

NAGESHA, H.S.; HOLMES, I.H. New porcine rotavirus serotype antigenically related to human rotavirus serotype 3. **Journal of Clinical Microbiology**, v.26, n.2, p. 171-174, 1988.

NAKAGOMI, T.; HORIE, Y.; KOSHIMURA, Y.; GREENBERG, H.B.; NAKAGOMI, O. Isolation of a Human Rotavirus Strain with a Super-Short RNA Pattern and a New P2 Subtype. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, n.4, p.1213-1216, 1999.

OLIVEIRA, C.S.; LINHARES, A.C.; BELLESI, N.; MASCARENHAS, J.D.; FREITAS, R.B.; GABBAY, Y.B.; MONTEIRO, T.F. Tripla infecção por rotavirus em uma criança de Belém, Pará. **Jornal de Pediatria (Rio)**, v.70, n.4, p.240-242, 1994.

PARRA, G.I.; GALEANO, M.E.; ARBIZA, J. Genetic relationship between porcine rotavirus strains bearing a new P-type. **Veterinary Microbiology**, v.125, n.1-2, p.193-195, 2007.

PARRA, G.I.; VIDALES, G.; GOMEZ, J.A.; FERNANDEZ, F.M.; PARRENO, V.; BOK, K. Phylogenetic analysis of porcine rotavirus in Argentina: Increasing diversity of G4 strains and evidence of interspecies transmission. **Veterinary Microbiology**, v.126, p.243-250, 2008.

PATTON, J.T. Structure and function of the rotavirus RNA binding proteins (Review article). **Journal of General Virology**, v.76, p.2633-2644, 1995.

PAUL, P.S.; LYOO, Y.S. Immunogens of Rotaviruses. **Veterinary Microbiology**, v.37, p.299-317, 1993.

PEDLEY, S.; BRIDGER, J.C.; CHASEY, D.; McCRAE, M.A. Definition of Two New Groups of Atypical Rotaviruses. **Journal of General Virology**, v.67, p.131-137, 1986.

PFIZER SAUDE ANIMAL.

<<http://www.pfizersaudeanimal.com.br/bovinos/Bulas/scourguard4KC.pdf>> Acesso em: 16 de Janeiro de 2009.

PONGSUWANNA, Y.; TANIGUCHI, K.; CHIWAKUL, M.; URASAWA, T.; WAKASUGI, F.; JAYAVASU, C.; URASAWA, S. Serological and Genomic Characterization of Porcine Rotaviruses in Thailand: Detection of a G10 Porcine Rotavirus. **Journal of Clinical Microbiology**, v.34, n.5, p.1050-1057, 1996.

RACZ, M.L.; KROEFF, S.S.; MUNFORD, V.; CARUZO, T.A.R.; DURIGON, E.L.; HAYASHI, Y.; GOUVEA, V.; PALOMBO, E.A. Molecular Characterization of Porcine Rotaviruses from the Southern Region of Brazil: Characterization of an Atypical Genotype G [9] Strain. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, n.6, p.2443-2446, 2000.

RAHMAN, M.; HASSAN, Z.M.; ZAFRUL, H.; SAIADA, F.; BANIK, S.; FARUQUE, A.S.G.; DELBEKE, T.; MATTHIJNSSENS, J.; RANST, M.V.; AZIM, T. Sequence analysis and evolution of group B rotaviruses. **Virus Research**, v.125, p.219-225, 2007.

RUIZ, A.M.; LOPEZ, I.V.; LOPEZ, S.; ESPEJO, R.T.; ARIAS, C.F. Molecular and antigenic characterization of porcine rotavirus YM, a possible new rotavirus serotype. **Journal of Virology**, v.62, n.11, p.4331-4336, 1988.

RUIZ-PALACIOS, G.M.; PEREZ-SCHAEEL, I.; VELAZQUEZ, F.R.; ABATE, H.; BREUER, T.; CLEMENS, S.C.; CHEUVART, B.; ESPINOZA, F.; GILLARD, P.; INNIS, B.L.; CERVANTES, Y.; LINHARES, A.C.; LOPEZ, P.; MACIAS-PARRA, M.; ORTEGA-BARRIA, E.; RICHARDSON, V.; RIVERA-MEDINA, D.M.; RIVERA, L.; SALINAS, B.; PAVIA-RUZ, N.; SALMERON, J.; RUTTIMANN, R.; TINOCO, J.C.; RUBIO, P.; NUNEZ, E.; GUERRERO, M.L.; YARZABAL, J.P.; DAMASO, S.; TORNIEPORTH, N.; SAEZ-LLORENS, X.; VERGARA, R.F.; VESIKARI, T.; BOUCKENOOGHE, A.; CLEMENS, R.; DE VOS, B.; O'RYAN, M. Safety and Efficacy of an Attenuated Vaccine against Severe Rotavirus Gastroenteritis. **The New England Journal of Medicine**, v.354, n.1, p.11-22, 2006.

SANTOS, N.; LIMA, R.C.C.; NOZAWA, C.M.; LINHARES, R.E.; GOUVEA, V. Detection of porcine rotavirus type G9 and of a mixture of types G1 and G5 associated with Wa-like VP4 specificity: evidence for natural human-porcine genetic reassortment. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, n.8, p.2734-2736, 1999.

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, p.29-56, 2005.

SCHUMANN, T.; HOTZEL, H.; OTTO, P.; JOHNE, R. Evidence of interspecies transmission and reassortment among avian group A rotaviruses. **Virology**, v.386, n.2, p.334-343, 2009.

SILVA, C.A.; BRITO, B.G.; MORES, N.; AMARAL, A.L. Fatores de Risco Relacionados com o Desempenho de Leitões Lactentes em Granjas de Suínos da Região Norte do Paraná. **Ciência Rural**, v.28, n.4, p.677-681, 1998.

SOLBERG, O.D.; HASING, M.E.; TRUEBA, G.; EISENBERG, J.N. Characterization of novel VP7, VP4, and VP6 genotypes of a previously untypeable group A rotavirus. **Virology**, v.385, n.1, p.58-67, 2009.

STEYER, A.; POLJSAK-PRIJATELJ, M.; BARLIC-MAGANJA, D.; JAMNIKAR, U.; MIJOVSKI, J.Z.; MARIN, J. Molecular characterization of a new porcine rotavirus P genotype found in an asymptomatic pig in Slovenia. **Virology**, v.359, p.275-282, 2007.

STEYER, A.; POLJSAK-PRIJATELJ, M.; BARLIC-MAGANJA, D.; MARIN, J. Human, porcine and bovine rotaviruses in Slovenia: evidence of interspecies transmission and genome reassortment. **Journal of General Virology**, v.89, p.1690-1698, 2008.

STUPKA, J.A.; CARVALHO, P.; AMARILLA, A.A.; MASSANA, M.; PARRA, G.I. National Rotavirus Surveillance in Argentina: High incidence of G9P[8] strains and detection of G4P[6] strains with porcine characteristics. **Infection, Genetics and Evolution**, v.9, p.1225-1231, 2009.

TEODOROFF, T.A.; TSUNEMITSU, H.; OKAMOTO, K.; KATSUDA, K.; KOHMOTO, M.; KAWASHIMA, K.; NAKAGOMI, T.; NAKAGOMI, O. Predominance of Porcine Rotavirus G9 in Japanese Piglets with Diarrhea: Close Relationship of Their VP7 Genes with Those of Recent Human G9 Strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, n.3, p.1377-1384, 2005.

TSUGAWA, T.; HOSHINO, Y. Whole genome sequence and phylogenetic analyses reveal human rotavirus G3P[3] strains Ro1845 and HCR3A are examples of direct virion transmission of canine/feline rotaviruses to humans. **Virology**, v.380, p.344-353, 2008.

URSU, K.; KISFALI, P.; RIGÓ, D.; IVANICS, E.; ERDÉLYI, K.; DÁN, Á.; MELEGH, B.; MARTELLA, V.; BÁNYAI, K. Molecular analysis of the VP7 gene of pheasant rotaviruses identifies a new genotype, designated G23. **Archives of Virology**, v.154, p.1365-1369, 2009.

VELAZQUEZ, F.R.; MATSON, D.O.; CALVA, J.J.; GUERRERO, M.L.; MORROW, A.L.; CARTER-CAMPBELL, S.; GLASS, R.I.; ESTES, M.K.; PICKERING, L.K.; RUIZ-PALACIOS, G.M. Rotavirus infections in infants as protection against subsequent infections. **The New England Journal of Medicine**, v.335, n.14, p.1022-1028, 1996.

VESIKARI, T. Rotavirus vaccines. (Review article). **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v.40, p.691-695, 2008.

WINIARCZYK, S.; PAUL, P.S.; MUMMIDI, S.; PANEK, R.; GRADZKI, Z. Survey of porcine rotavirus G and P genotype in Poland and the United States using RT-PCR. **Journal of Veterinary Medicine B**, v.49, p.373-378, 2002.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Caracterizar o genotipo P (gene VP4) presente em estirpes de PoRV-A identificadas em um foco de diarreia neonatal em uma granja do estado de Santa Catarina com esquema regular de vacinação contra rotavirose suína.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Amplificar por RT-PCR uma sequência *consensus* com 876 pb do gene VP4 (genotipo P) em amostras de fezes de leitões identificadas, pela técnica ss-PAGE, como positivas para rotavírus;
- Determinar o genotipo P presente em estirpes de PoRV-A por meio da técnica de multiplex-nesíe^[^]-PCR realizada com *pools* de *primers* específicos para amplificação de genotipos P mais frequentes em estirpes virais de origem animal e humana;
- Determinar a sequência de nucleotídeos de produtos *consensus* do gene VP4 amplificados por RT-PCR em amostras de PoRV-A;
- Determinar a filogenia molecular dos genotipos P identificados em amostras de PoRV- A.

Detection of a human-like rotavirus P[6] genotype in a neonatal diarrhea outbreak in a regularly vaccinated pig herd

Detection of a human-like rotavirus P[6] genotype in a neonatal diarrhea outbreak in a regularly vaccinated pig herd

Abstract

The P genotypes (VP4 gene) of the 20 wild-type porcine group A rotavirus (PoRV-A) strains were determined by multiplex-nested-PCR assay. The PoRV-A strains were identified by ss-PAGE and RT-PCR assay in stool samples from suckling (\leq 3-week-old) and weaning (4-week-old) piglets in a diarrhea outbreak in a pig production system in the state of Santa Catarina, South of the Brazil. The herd had good management practices and the sows were vaccinated regularly with a commercial vaccine for neonatal diarrhea against PoRV-A genotypes G5P[7] (OSU strain) and G4P[6] (Gottfried strain). For the PoRV-A P genotyping were used two pools of P type-specific primers for RV-A of animal origin (P[1], P[5], P[6], P[7], and P[11]) and human origin (P[4], P[6], P[8], and P[9]). In all the 20 wild-type PoRV-A strains included in this study was only amplified a PCR product with 267 bp length that belong to the P[6] genotype present in RV-A strains of human origin (M37-like strains). The sequencing and phylogenetic analysis carried out in a 586 bp length product of the VP4 gene (VP8*) of four Brazilian wild-type PoRV-A strains allowed to classify two strains (BRA838/07-Po and BRA844/07-Po) as P[6]-Ie genotype and the other two strains (BRA843/07-Po and BRA898/07-Po) as P[6]-If genotype. The genotype sublineages P[6]-Ie and If were recently described in RV-A strains of human origin. This is the first description of P[6]-Ie and If genotypes in RV-A strains of porcine origin. These findings suggest that the neonatal diarrhea outbreak might have been resulted of interspecies transmission of RV-A. The regularly sows vaccination with a rotavirus commercial vaccine containing P[6] genotype of porcine origin (Gottfried strain) might have provide the disappearance of the genotype P[6]-II (Gottfried-like) of porcine origin and the selection of RV-A strains with VP4 gene described only in RV-A strains of human origin such as P[6]-Ie and If. Heterologous infections are described in rotavirus infections in human beings and in animals. Rotavirus vaccination failures can occur in RV-A infections with viruses strains carrying P and/or G genotypes different from those presents in the vaccine. The neonatal diarrhea outbreak in a regularly vaccinated pig herd and the characterization of PoRV-A strains with atypical P genotypes described in this study highlight the importance of the epidemiological studies of human and animal rotaviruses.

Keywords: Piglets. Group A rotaviruses. VP4 gene. P[6] genotype.

Introduction

The rotaviruses are the main viral etiology of diarrhea in children and young animals of wide variety species of mammals and birds throughout the world (Alfieri et al., 1999a,b; Tamehiro et al., 2003; Alfieri et al., 2004; Elschner et al., 2005; Barman et al., 2006). Based on antigenic characteristics of the VP6 protein that compose the middle layer of the viral capsid, the rotaviruses can be classified in seven (A-G) distinct serological groups (Estes and Kapikian, 2007).

The group A rotavirus (RV-A) is the most common cause of acute gastroenteritis in the young children and neonatal diarrhea in production animals such as piglets and calves (Tsai; Chiu; Abe, 2000; Alfieri et al., 2006; Linares et al., 2009; Halaihel et al., 2010). According to the antigenic and molecular characteristics of the two proteins (VP7 and VP4) present in the outer layer of viral capsid, the RV-A can be classified into serotypes / genotypes G and P, respectively (Estes and Kapikian, 2007). So far, have been described 23 G genotypes and 31 P genotypes in RV-A strains identified in human and animal hosts (Parra; Galeano; Arbiza, 2007; Abe et al., 2009; Schumann et al., 2009; Solberg et al., 2009; Ursu et al., 2009).

The diarrhea is the most important health problem in the suckling and weaned piglets around the world (Katsuda et al., 2006; Zlotowski; Driemeier; Barcellos, 2008). The neonatal diarrhea increased the morbidity and mortality rates in maternity and nursery of pig farms worldwide causing direct and indirect economic losses to the pig industry (Wittum et al., 1995). The groups A, B, and C rotaviruses are described as causes of neonatal diarrhea in pigs (Magar; Robinson; Morin, 1991; Barreiros et al., 2003; Martella et al., 2007; Linares et al., 2009; Médici et al., 2010). However, the RV-A infections are the most frequently identified in episodes of diarrhea in piglets throughout the world (Santos et al., 1999; Rácz et al., 2000;

Martella et al., 2001; Ghosh et al., 2006; Parra et al., 2008; Linares et al., 2009; Halaihel et al., 2010).

There is a diversity of G (VP7) and P (VP4) genotypes described in RV-A strains identified in symptomatic and asymptomatic infections in pigs. Nevertheless, G3, G4, G5, G11, P[6], and P[7] are the more frequent genotypes identified in wild-type RV-A strains isolated of diarrhea episodes in piglets (Ciarlet et al., 1994; Winiarczyk et al., 2002; Barreiros et al., 2003). The four main combinations between G and P genotypes in porcine RV-A (PoRV-A) strains are G5P[7], G4P[6], G11P[7], and G3P[7]. These genotypes combinations are represented by the PoRV-A prototypes strains denominated OSU, Gottfried, YM, and CRW8, respectively (Nagesha and Holmes, 1988; Ruiz et al., 1988; Barreiros et al., 2003; Parra et al., 2008).

The P[6] genotype was first identified in a RV-A strain of porcine origin (Gottfried strain) isolated from the intestinal content of a suckling piglet with diarrhea (Bohl et al., 1984). Later, the RV-A P[6] strains were identified in symptomatic and asymptomatic infections in human beings (Gorziglia et al., 1988; Kirkwood et al., 1999; Mascarenhas et al., 2007b). P[6] genotype of RV-A strains described in human and porcine were analyzed and although the relationship between them were considered as molecular and antigenically distinct (Li and Gorziglia, 1993).

Based on nucleotide (nt) and deduced amino acid (aa) sequences and in phylogenetic analysis it is possible to show genetic heterogeneity in P[6] genotype of wild type RV-A strains. This genotype has been phylogenetically classified into five distinct lineages (I-V) (Nakagomi et al., 1999; Bányai et al., 2004; Martella et al., 2006). The lineages I, III, and V present virus strains of human and porcine origin, while the lineages II and IV present only virus strains of porcine (Gottfried) and human origin (BP1198/98-like), respectively (Martella et al., 2006).

The P[6] genotype of RV-A strains belonging the lineages I and V are subdivided in sublineages. Until now, were described six sublineages in the lineage I (Ia-If) and two sublineage in the lineage V (Va-Vb). The P[6] sublineages Ia, Ie, and If are constituted only by RV-A strains of human origin, while the sublineages Ib, Ic, and Id present virus strains isolated of both human and porcine. Also the sublineage Va contain just P[6] genotype strains of porcine origin, while the sublineage Vb present RV-A strains of human and porcine origin (Martella et al., 2006, Mascarenhas et al., 2007a; Duan et al., 2007; Steyer et al., 2008; Martella et al., 2008; Stupka et al., 2009; Bányai et al., 2009).

This study describes the identification of the lineage and sublineage of wild-type Brazilian PoRV-A strains genotype P[6] isolated in a diarrhea outbreak in piglets of a pig farm with management of regular vaccination against porcine rotaviruses.

Materials and Methods

Herd and outbreak

During the months of May to June of 2007 an outbreak of diarrhea was detected in suckling (≥ 3 -week-old) and recently weaned (4-week-old) piglets on a pig farm located in the state of Santa Catarina, South area of Brazil. The herd was of complete cycle with 500 sows under confinement system (all-in / all-out) and good management (nutritional, zootechnic, and health) practices. All sows were routinely vaccinated with a attenuated commercial vaccine for neonatal diarrhea control that included either OSU (G5P[7]) and Gottfried (G4P[6]) PoRV-A strains. Besides to viral antigens the vaccine contains K88, K99, 987P, and F41 antigens of *Escherichia coli* and the *Clostridium perfringes* type C.

Stool samples and selection criteria

It were evaluated 80 stool samples collected in May (n=64) and June (n=16), 2007. Of the evaluated samples 49 (61.2%) were diarrheic and 31 (38.7%) had normal consistency (control group). It were included stool samples of suckling piglets with one (n=20), two (n=21), and three (n=16) week-old and recently-weaned (4-week-old) piglets (n=23). All fecal samples were previously analyzed by ss-PAGE (silver-stained polyacrylamide gel electrophoresis) carried out according Herring et al. (1982). Electropherotype profile of RV-A with short pattern (10-11 genomic segments) was identified in 22 (27.5%) fecal samples of which 16 (72.7%) were diarrheic and 6 (27.3%) with normal consistency (Figure 1). The RV-A infection was detected in piglets of all age groups evaluated in this study. The genotyping analysis was carried out with 20 wild-type PoRV-A strains.

RNA extraction

The viral dsRNA extraction was performed using fecal suspensions 20% (w/v) in Tris/Ca⁺⁺ buffer (50 mM Tris-HCl; 10 mM NaCl; 1.5 mM 2-mercaptoetanol; 3 mM CaCl₂; pH 7.2), centrifuged at 2.000 x g for 5 min at 4 °C. Aliquots of 450 µL of supernatant and 50 µL SDS 10% were homogenized and incubated at 56°C for 20 min. Later, a combination of phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1) and silica/guanidinium isothiocyanate nucleic acid extraction methods was performed as described by Alfieri et al. (2006). The RNA was eluted in 50 µL of ultrapure (MilliQ[®]) sterile water and kept at -20°C until use. Aliquots of Tris-Ca⁺⁺ buffer were included as negative controls in all viral RNA extraction procedures.

RT-PCR

The RT-PCR assay was performed using 5 μ L of extracted RNA and VP4 (P type) consensus primers con2 and con3 designed to amplify a product with 876 bp of VP4 gene (VP8*) carried out according Gentsch et al. (1992).

Multiplex-nested-PCR

The identification of P genotype was performed with a multiplex-nested-PCR assay using two pools of P type-specific primers, being one pool for human (P[4], P[6], P[8], and P[9]) and another for animal (P[1], P[5], P[6], P[7], and P[11]) rotavirus prototype strains, as described by Gentsch et al. (1992) and Gouvea; Santos; Timenetsky. (1994), respectively. The P[6] genotype-specific primer included in the pool for amplification of P type present in human strains of RV-A was designed on the sequence of the 1076 strain to recognize the M37-like P2A[6] strains. For the animal origin RV-A strains the P[6] specific primer included in the pool was the primer pGott designed to recognize the Gottfried-like P2B[6] porcine strains. These primers amplify a DNA fragment of 267 bp and 423 bp, respectively. The multiplex-nested-PCR assay was carried out according Gentsch et al. (1992).

Analysis of amplified products

The RT-PCR and multiplex-nested-PCR amplified products were analyzed by electrophoresis in 2% agarose gel in TBE buffer pH 8.4 (89 mM Tris; 89 mM boric acid; 2 mM EDTA) at constant voltage (100V) for approximately 90 min, ethidium bromide (0.5 μ g/mL) stained and visualized under UV light.

Sequencing and phylogenetic analysis

Four diarrheic wild-type strains identified in second ($n=1$), third ($n=2$) and fourth ($n=1$) week-old piglets were selected for P consensus amplicon (876 bp) sequencing. The RT-PCR products were purified using GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, USA), quantified in Qubit™ Fluorometer (Invitrogen Life Technologies, USA) and sequenced in MegaBACE™ 1000/Automated 96 Capillary DNA Sequence, Thermo Sequenase™ II DNA Polymerase and the DYEnamic™ ET Dye Terminator Kit (GE Healthcare, USA) using the forward and reverse primers. Sequence editing was 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 BLAST software (Basic Local Alignment Search Tool - <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). A multiple and pairwise alignments were realized in CLUSTAL W (version 1.4) using MEGA package version 4.1 software and sequence identity matrix using BioEdit software version 7.0.8.0. Phylogenetic tree based on the nucleotide was obtained using neighbor-joining method on the model Kimura two-parameter, using MEGA version 4.1 software. Bootstrap support values were determined for 1000 replications. Nucleotide distance was obtained using pairwise distance calculation on the model Kimura two-parameter, using MEGA version 4.1 software.

Results

The RT-PCR assay with P consensus (con2-con3) primers amplified a product with 876 bp of RV-A VP4 gene in all the 20 stool samples evaluated. The genotyping analysis, carried out by multiplex-nested-PCR using two primers pool for the identification of P types

present in RV-A strains of human and animal origin, yield only a 267 bp amplicon in all the 20 fecal samples analyzed. This molecular size correspond to the amplified product by the M37 primer specific for the RV-A P[6] genotype of HuRV-A strains. No samples was amplified by pGott primer that amplify RV-A P[6] genotype strains of porcine origin (Figure 2).

The sequence of the VP8* cleavage product of VP4 gene of the four PoRV-A were determined and compared with P genotypes sequences described in the public database (GenBank). A fragment with 702 nt (104-805 nt) and 235 aa (35-269 aa) of the four Brazilian wild-type PoRV-A sequences presented high identity (88.7 to 89.3% nt and 90.3 to 91.6% aa) with human prototype of the P[6] genotype M37 strain and 79.7 to 80.1% nt and 82.4 to 83.3% aa with the porcine prototype Gottfried strain. The phylogenetic tree constructed using nt and aa sequence displayed that all four sequences belong to the same branch of the human prototype (M37 strain) of the P[6] genotype (data not shown).

Later, the nucleotide sequences of four Brazilian P[6] PoRV-A strains were aligned with prototypes and strains representing of the five P[6] genotype lineages and of the six sublineage I and two sublineage V. The four sequences of Brazilian wild-type PoRV-A (BRA838/07-Po, BRA843/07-Po, BRA844/07-Po, BRA898/07-Po), clustered with the M37 strain belong to the genetic lineage I with bootstrap value 98%, which include mainly human strains and a few recently described porcine strains. The higher similarity was 88.4 to 92.4% in nt with human and porcine strains of P[6] genotype lineage I.

Notably, none of the four Brazilian wild-type P[6] PoRV-A strains analyzed in this study resembling to the porcine prototype P[6] Gottfried strain, that represent the lineage II. The nt similarity of the PoRV-A BRA838/07-Po, BRA843/07-Po, BRA844/07-Po, BRA898/07-Po and the Gottfried strain was from 78.6 to 79.2%.

Within of the lineage P[6]-I, the BRA838/07-Po and BRA844/07-Po strains, presented high identity (92 and 92.4% in nt) with the sublineage Ie. The other two strains (BRA843/07-Po and BRA898/07-Po) presented high identity with sublineage If (92.2 and 92.4% in nt) (Anexo E). The figure 3 present the phylogenetic tree of RV-A P[6] genotype including the four wild-type Brazilian strains identified in the diarrhea outbreak in piglets described in this study.

The nucleotide distance (nt 111-693) of RV-A P[6] VP4 gene between lineages ranged from >14.41% and between sublineages from 7.75 to 11.96%. The strains BRA838/07-Po and BRA844/07-Po exhibited smaller distance (7.66 - 8.66%) in nt with sublineage Ie, and the strains BRA843/07-Po and BRA898/07-Po with sublineage If (8%) (Anexo F).

Discussion

PoRV-A is one of the most frequently identified viruses in neonatal diarrhea in pigs worldwide (Martella et al., 2001; Ghosh et al., 2006; Parra et al., 2008) and also have been detected in many pork production regions of the Brazil (Santos et al., 1999; Rácz et al., 2000; Barreiros et al., 2003; Linares et al., 2009; Halaihel et al., 2010).

The results of this study demonstrate that the outbreak of neonatal diarrhea in suckling (\geq 3-week-old) and recently weaned (4-week-old) piglets that occurred in a Brazilian pig herd regularly vaccinated against rotaviruses was caused by PoRV-A as 32.65% of the diarrheic fecal samples included in this study were positive for this virus.

There are some reports of the occurrence of diarrhea caused by RV-A in children and animals regularly vaccinated (Barreiros et al., 2004; Gurgel et al., 2007). These episodes can be produce by immune pressure developed by mass vaccination and not due to vaccine failures causing the emergence of new genotypes of RV-A (Matthijnsens et al., 2009).

The multiplex-nested-PCR assay using pools of primers for P genotyping of RV-A strains of human and animal origin, allowed the characterization of the P genotype of all PoRV-A strains analyzed. As the amplified products had 267 bp size was possible to characterize the P[6] genotype of the 20 wild-type PoRV-A strains isolated in the diarrhea outbreak described in this study as the human origin.

The 3T-1 primer, that amplify a product of 267 bp length, was designed to recognize M37-like strains of HuRV-A that belong to the P[6] genotype lineage I (Gentsch et al., 1992). None of the PoRV-A strains identified in this neonatal diarrhea outbreak was amplified by the primer pGott described by Gouvea; Santos; Timenetsky. (1994), normally used to recognize the P[6] genotype in the PoRV-A Gottfried-like strains.

The P[6] genotype is commonly found in PoRV-A strains and is represented by the porcine prototype Gottfried (G4P[6]) strain (Gouvea; Santos; Timenetsky, 1994; Winiarczyk et al., 2002). This genotype was also identified in RV-A strains detected in stool samples from children (Nakagomi et al., 1999; Bányai et al., 2004; Mascarenhas et al., 2006). However, P[6] genotype described in human and porcine RV-A strains present molecular and antigenic differences.

Recently, some studies also identified the P[6] genotype of human origin in diarrheic porcine fecal samples using the human 3T-1 primer genotyping and amplicon sequencing (Rácz et al., 2000; Martella et al., 2006; Steyer et al., 2008).

The nt sequence analysis of the partial VP4 gene, amplified by RT-PCR assay with con2 and con3 primers, ratify that the four PoRV-A strains had higher identity with the P[6] genotype lineage I of the human origin than with genotype P[6] lineage II of the porcine origin. Another studies also detected a close relationship between P[6] strains from animal and human origin (Teodoroff et al., 2005; Martella et al., 2006).

The phylogenetic analysis of the Brazilian wild-type PoRV-A strains showed that two strains (BRA838/07-Po and BRA844/07-Po) clustered into the sublineage Ie and the others two strains (BRA843/07-Po and BRA898/07-Po) into sublineage If. These P[6] sublineage were recently reported in studies with HuRV-A strains carried out in Brazil and Argentina (Mascarenhas et al. 2007a; Stupka et al., 2009).

The sublineage Ie was identified for the first time in stool samples from a neonate hospitalized in Belém, Brazil presenting community-acquired diarrhea (Mascarenhas et al., 2007a). Later, the sublineage Ie was described again in six HuRV-A strains isolated in symptomatic children from Belém, Brazil (Mascarenhas et al., 2007b). Recently, the sublineage P[6]-If was detected in two human fecal samples from infants of 9 and 12-months-old with vomiting and acute diarrhea concurrent in Argentina (Stupka et al., 2009).

Animals are regarded as a potential reservoir for genetic and antigenic diversity of human rotaviruses (Palombo, 2002). The events of interspecies transmission and genetic reassortment involving human and animal rotaviruses has been commonly found in some domestic animals such as cows, cats, dogs, and pigs. These events contribute to antigenic and genetic diversity found in human rotaviruses, mainly for the closed relationship between human being and these animal species (Matthijnsens et al., 2006; Duan et al., 2007; Tsugawa and Hoshino, 2008; Parra et al., 2008; Martella et al., 2010). There are many studies that related the interspecies transmission and genetic reassortment of RV-A P[6] genotype involving human and pigs, where strains detected in human host can have porcine origin (Duan et al., 2007; Mascarenhas et al., 2007a,b; Li et al., 2008; Martella et al., 2008; Bányai et al., 2009; Mukherjee et al., 2009; Stupka et al., 2009) or where porcine strains can have human origin (Teodoroff et al., 2005; Martella et al., 2006).

The verification that the VP4 gene of the four Brazilian wild-type PoRV-A strains had more nt similarities with human strains P[6]-Ie and If than with P[6] porcine strain lineage II,

suggested that the BRA838/07-Po, BRA843/07-Po, BRA844/07-Po, and BRA898/07-Po porcine strains had human origin.

The emergency of a different RV-A genotype or new genetic variants of a specific genotype or still the re-emergence of some genotypes that were previously controlled for vaccine can emerge or spread in the population in appropriate conditions. The immune pressure induced by mass vaccination could promote reassortment, rearrangement, and zoonotic transmission between animal-human (Matthijssens et al., 2009).

This PoRV-A diarrhea outbreak in a regularly vaccinated pig herd provides evidence of the substitution of the animal P[6] genotype (Gottfried-like strain) and the appearance of the human P[6] genotype in suckling and recently weaned piglets.

To the best of our knowledge this is the first report of the P[6] genotype sublineages Ie and If in RV-A strains of porcine origin. The occurrence of the genotype P[6]-Ie and If in a Brazilian pig herd provide information about the circulation of these RV-A strains in animals and provide a possible evidence of interaction between human and porcine viruses.



Figure 1. Electrophoretic migration pattern of RNAs, Brazilian P[6] genotype (P[6]-Gottfried-like and P[6]-M37-like) rotaviruses strains, finding in porcine stool samples, analyzed by electrophoresis in 7,5% polyacrylamide gel and visualized by staining with silver nitrate. Lane 1, P[6]-Gottfried-like genotype electropherotype "long"; lane 2 and 3, P[6]-M37-like genotype electropherotype "short".

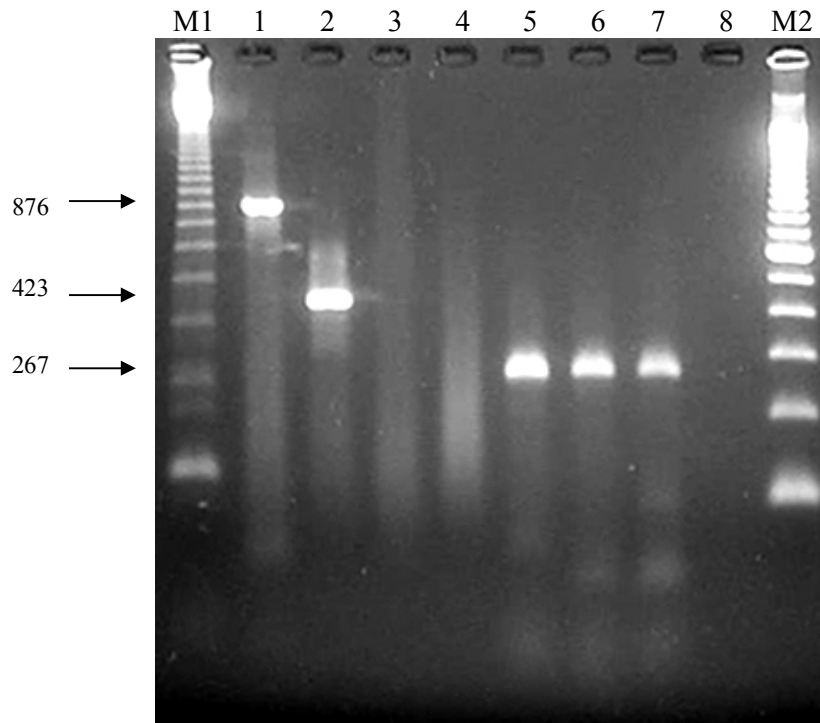


Figure 2. RT-PCR and multiplex-nested-PCR assays of porcine group A Rotavirus VP4 gene in fecal specimens from piglets in an outbreak of neonatal diarrhea. Lane M1, molecular weight marker 123 bp ladder (Invitrogen™ Life Technologies, USA); lane 1, porcine VP4 consensus group A rotavirus with 876 bp; lane 2, porcine P[6] genotype pattern (Gottfried); lane 3 and 4, negative specimens by multiplex-nested-PCR using primers animal pool; lane 5, human P[6] genotype pattern (M37); lane 6, amplified product the multiplex-nested-PCR using primers human pool (P[6]-Ie); lane 7, amplified product of multiplex-nested-PCR using primers human pool (P[6]-If); lane 8, negative control; lane M2, molecular weight marker 100 bp ladder (Invitrogen™ Life Technologies, USA).

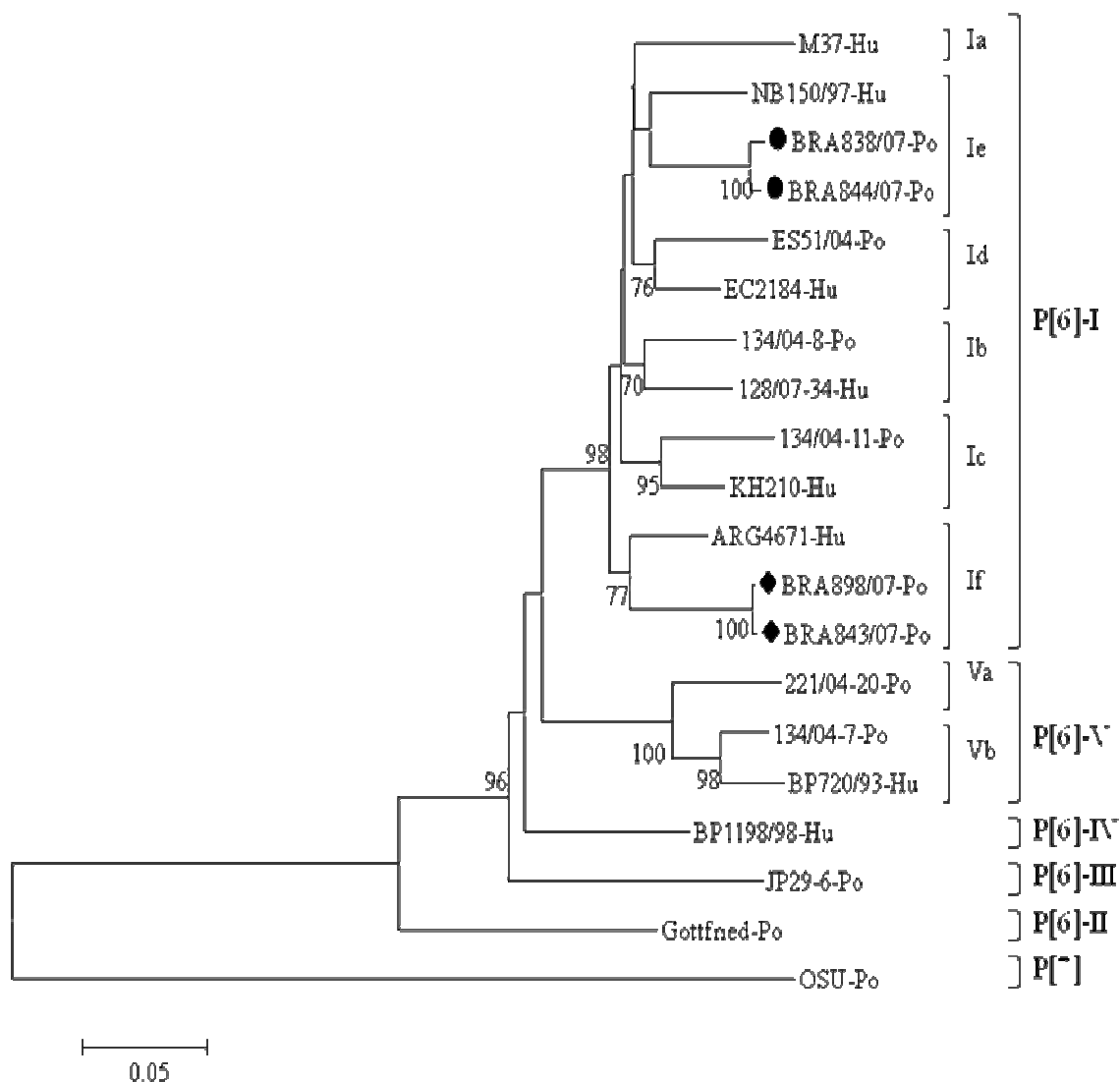


Figure 3. Phylogenetic analysis of the VP4 (nt 111-696) genes from Brazilian P[6] genotype rotaviruses strains and another worldwide strains. The tree was constructed using neighbor-joining for tree reconstruction and Kimura two-parameter as a nucleotide substitution model. Bootstrap values are shown at the branch nodes (values <70% not shown). The Brazilian P[6]-Ie strains isolated from 2007 are marked with a filled circle and the P[6]-If with a filled diamond. Sequences used in the alignment were acquired from GenBank as follows accession numbers: M37 (L20877), 128/07-34 (EU734175), 134/04-8 (AY955301), 134/04-11 (AY955300), KH210 (AB271687), ES51/04 (AY955306), EC2184 (GQ149094), NB150/97 (DQ299877), ARG4671 (FJ712691), Gottfried (M33516), JP29-6 (AB176688), BP1198/98 (AJ621504), 221/04-20 (AY955308), 134/04-7 (AY955310), BP720/93 (AJ621503), OSU (X13190)-outgroup. Abbreviations: Hu, human Po, porcine.

References

Abe, M.; 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, p.250-257, 2009.

Alfieri, A.A.; Alfieri, A.F.; Beuttemüller, E.A.; Brito, B.G.; Médici, K.C. Aspectos epidemiológicos da rotavírose suína na região sudoeste do estado do Paraná. *Semina: Ciências Agrárias*, v.20, n.1, p.5-11, 1999a.

Alfieri, A.A.; Leite, J.P.G.; Alfieri, A.F.; Jiang, B.; Glass, R.I.; Gentsch, J.R. Detection of field isolates of human and animal group C rotavirus by reverse transcription-polymerase chain reaction and digoxigenin-labeled oligonucleotide probes. *Journal of Virological Methods*, v.83, p.35-43, 1999b.

Alfieri, A.F.; Alfieri, A.A.; Barreiros, M.A.B.; Leite, J.P.G.; Richtzenhain, L.J. G and P genotypes of group A rotavirus strains circulating in calves in Brazil, 1996-1999. *Veterinary Microbiology*, v.99, 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 and Production*, v.38, p.521-526, 2006.

Bányai, K.; Martella, V.; Jakab, F.; Melegh, B.; Szucs, G. Sequencing and Phylogenetic Analysis of Human Genotype P[6] Rotavirus Strains Detected in Hungary Provides Evidence for Genetic Heterogeneity within the P[6] VP4 Gene. *Journal of Clinical Microbiology*, v.42, n.9, p. 4338-4343, 2004.

Bányai, K.; Esona, M.D.; Kerin, T.K.; Hull, J.J.; Mijatovic, S.; Vásconcez, N.; Torres, C.; Fillipis, A.M.B.de.; Foytich, K.R.; Gentsch, J.R. Molecular characterization of a rare, human-porcine reassortant rotavirus strain, G11P[6], from Ecuador. *Archives of Virology*, v.154, p.1823-1829, 2009.

Barman, P.; Ghosh, S.; Samajdar, S.; Mitra, U.; Dutta, P.; Bhattacharya, S.K., Krishnan, T.; Kobayashi, N.; Naik, T.N. RT-PCR based diagnosis revealed importance of human group B rotavirus infection in childhood diarrhoea. *Journal of Clinical Virology*, v.36, p.222-227, 2006.

Barreiros, M.A.B.; Alfieri, A.A.; Alfieri, A.F.; Médici, K.C.; Leite, J.P.G. An outbreak of diarrhoea in one-week-old piglets caused by group A rotavirus genotypes P[7],G3 and P[7],G5. *Veterinary Research Communications*, v.27, p.505-512, 2003.

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 B*, v.51, p.104-109, 2004.

Bohl, E.H.; Theil, K.W.; Saif, L.J. Isolation and Serotyping of Porcine Rotaviruses and Antigenic Comparison with Other Rotaviruses. *Journal of Clinical Microbiology*, v.19, n.2, p.105-111, 1984.

Ciarlet, M.; Hidalgo, M.; Gorziglia, M.; Liprandi, F. Characterization of neutralization epitopes on the VP7 surface protein of serotype G11 porcine rotaviruses. *Journal of General Virology*, v.75, p.1867-1873, 1994.

Duan, Z-J.; Li, D-D.; Zhang, Q.; Liu, N.; Huang, C-P.; Jiang, X.; Jiang, B.; Glass, R.; Steele, D.; Tang, J-Y.; Wang, Z-S.; Fang, Z-Y. Novel human rotavirus of genotype G5P[6] identified in a stool specimen from a Chinese girl with diarrhea. *Journal of Clinical Microbiology*, v.45, n.5, p.1614-1617, 2007.

Elschner, M.; Schrader, C.; Hotzel, H.; Prudlo, J.; Sachse, K.; Eichhorn, W.; Herbst, W.; Otto, P. Isolation and molecular characterisation of equine rotaviruses from Germany. *Veterinary Microbiology*, v.105, p.123-129, 2005.

Estes, M.K.; Kapikian, A.Z. Rotaviruses. In: Knipe, D.M.; Howley, P.M. (ed.) *Fields Virology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p.1917-1974, 2007.

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, p.1365-1373, 1992.

Ghosh, S.; Varghese, V.; Samajdar, S.; Bhattacharya, S.K.; Kobayashi, N.; Naik, T.N. Molecular characterization of a porcine group A rotavirus strain with G12 genotype specificity. *Archive of Virology*, v.151, p.1329-1344, 2006.

Gouvea, V.; Santos, N.; Timenetsky, M.C. VP4 typing of bovine and porcine group A rotaviruses by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, v.32, p.1333-1337, 1994.

Gorziglia, M.; Green, K.; 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.8, p.2978-2984, 1988.

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.

Halaihel, N.; Masía, R.M.; Fernández-Jiménez, M.; Ribes, J.M.; Montava, R.; De Blas, I.; Gironés, O.; Alonso, J.L.; Buesa, J. Enteric calicivirus and rotavirus infections in domestic pigs. *Epidemiology and Infection*, v.138, n.4, p.542-548, 2010.

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.

Katsuda, K.; Kohmoto, M.; Kawashima, K.; Tsunemitsu, H. Frequency of enteropathogen detection in suckling and weaned pigs with diarrhea in Japan. *Journal of Veterinary*

Diagnostic Investigation, v.18, p.350-354, 2006.

Kirkwood, C.D.; Gentsch, J.R.; Hoshino, Y.; Clark, H.F.; Glass, R.I. Genetic and Antigenic Characterization of a Serotype P[6]G9 Human Rotavirus Strain Isolated in the United States. *Virology*, v.256, p.45-53, 1999.

Li, B.; Gorziglia, M. VP4 Serotype of the Gottfried Strain of Porcine Rotavirus. *Journal of Clinical Microbiology*, v.31, n.11, p.3075-3077, 1993.

Li, D-D.; Duan, Z-J.; Zhang, Q.; Liu, N.; Xie, Z-P.; Jiang, B.; Steele, D.; Jiang, X.; Wang, Z-S.; Fang, Z-Y. Molecular characterization of unusual human G5P[6] rotaviruses identified in China. *Journal of Clinical Virology*, v.42, p.141-148, 2008.

Linares, R.C.; Barry, A.F.; Alfieri, A.F.; Médici, K.C.; Feronato, C.; Grieder, W.; Alfieri, A.A. Frequency of Group A Rotavirus in Piglet Stool Samples from Non-Vaccinated Brazilian Pig Herds. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v.52, p.63-68, 2009.

Magar, R.; Robinson, Y.; Morin, M. Identification of Atypical Rotaviruses in Outbreaks of Preweaning and Postweaning Diarrhea in Quebec Swine Herds. *Canadian Journal of Veterinary Research*, v.55, p.260-263, 1991.

Martella, V.; Pratelli, A.; Greco, G.; Tempesta, M.; Ferrari, M.; Losio, M.N.; Buonavoglia, C. Genomic characterization of porcine rotaviruses in Italy. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, v.8, n.1, p.129-132, 2001.

Martella, V.; Bányai, K.; Ciarlet, M.; Iturriza-Gomara, M.; Lorusso, E.; De Grazia, S.; Arista, S.; Decaro, N.; Elia, G.; Cavalli, A.; Corrente, M.; Lavazza, A.; Baselga, R.; Buonavoglia, C. Relationships among porcine and human P[6] rotaviruses: evidence that the different human P[6] lineages have originated from multiple interspecies transmission events. *Virology*, v.344, p.509-519, 2006.

Martella, V.; Bányai, K.; Lorusso, E.; Bellacicco, A.L.; Decaro, N.; Camero, M.; Bozzo, G.; Moschidou, P.; Arista, S.; Pezzotti, G.; Lavazza, A.; Buonavoglia, C. Prevalence of group C rotaviruses in weaning and post-weaning pigs with enteritis. *Veterinary Microbiology*, v.123, p.26-33, 2007.

Martella, V.; Colombrita, D.; Lorusso, E.; Draghin, E.; Fiorentini, S.; De Grazia, S.; Bányai, K.; Ciarlet, M.; Caruso, A.; Buonavoglia, C. Detection of a porcine-like rotavirus in a child with enteritis in Italy. *Journal of Clinical Microbiology*, v.46, n.10, p.3501-3507, 2008.

Martella, V.; Bányai, K.; Matthijnsens, J.; Buonavoglia, C.; Ciarlet, M. Zoonotic aspects of rotaviruses. *Veterinary Microbiology*, v.140, n.3-4, p.246-255, 2010.

Mascarenhas, J.D.P.; Linhares, A.C.; Bayma, A.P.G.; Lima, J.C.; Sousa, M.S.; Araújo, I.T.; Heinemann, M.B.; Gusmão, R.H.P.; Gabbay, Y.B.; Leite, J.P.G. Molecular analysis of VP4, VP7, and NSP4 genes of P[6]G2 rotavirus genotype strains recovered from neonates admitted to hospital in Belém, Brazil. *Journal of Medical Virology*, v.78, p.281-289, 2006.

Mascarenhas, J.D.P.; Leite, J.P.G.; Lima, J.C.; Heinemann, M.B.; Oliveira, D.S.; Araújo, I.T.; Soares, L.S.; Gusmão, R.H.P.; Gabbay, Y.B.; Linhares, A.C. Detection of a neonatal human

rotavirus strain with VP4 and NSP4 genes of porcine origin. *Journal of Medical Microbiology*, v.56, p.524-532, 2007a.

Mascarenhas, J.D.P.; Linhares, A.C.; Gabbay, Y.B.; Lima, C.S.; Guerra, S.F.S.; Soares, L.S.; Oliveira, D.S.; Lima, J.C.; Macêdo, O.; Leite, J.P.G. Molecular characterization of VP4 and NSP4 genes from rotavirus strains infecting neonates and Young children in Belém, Brazil. *Virus Research*, v.126, p. 149-158, 2007b.

Matthijnssens, J.; Rahman, M.; Yang, X.; Delbeke, T.; Arijs, I.; Kabue, J-P.; Muyembe, J-J.T.; Ranst, M.V. G8 Rotavirus Strains Isolated in the Democratic Republic of Congo Belong to the DS-1-Like Genogroup. *Journal of Clinical Microbiology*, v.44, n.5, p.1801-1809, 2006.

Matthijnssens, J.; Bilcke, J.; Ciarlet, M.; Martella, V.; Bányai, K.; Rahman, M.; Zeller, M.; Beutels, P.; Damme, P.V.; Ranst, M.V. Rotavirus disease and vaccination: impact on genotype diversity. *Future Microbiology*, v.4, n.10, p.1303-1316, 2009.

Médici, K.C.; Barry, A.F.; Alfieri, A.F.; Alfieri, A.A. Genetic analysis of the porcine group B rotavirus NSP2 gene from wild-type Brazilian strains. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.43, p.13-16, 2010.

Mukherjee, A.; Dutta, D.; Ghosh, S.; Bagchi, P.; Chattopadhyay, S.; Nagashima, S.; Kobayashi, N.; Dutta, P.; Krishnan, T.; Naik, T.N.; Chawla-Sarkar, M. Full genomic analysis of a human group A rotavirus G9P[6] strain from Eastern India provides evidence for porcine-to-human interspecies transmission. *Archives of Virology*, v.154, p.733-746, 2009.

Nagesha, H.S.; Holmes, I.H. New porcine rotavirus serotype antigenically related to human rotavirus serotype 3. *Journal of Clinical Microbiology*, v.26, n.2, p.171-174, 1988.

Nakagomi, T.; Horie, Y.; Koshimura, Y.; Greenberg, H.B.; Nakagomi, O. Isolation of a Human Rotavirus Strain with a Super-Short RNA Pattern and a New P2 Subtype. *Journal of Clinical Microbiology*, v.37, n.4, p.1213-1216, 1999.

Palombo, E.A. Genetic Analysis of Group A Rotaviruses: Evidence for Interspecies Transmission of Rotavirus Genes. *Virus Genes*, v.24, n.1, p.11-20, 2002.

Parra, G.I.; Galeano, M.E.; Arbiza, J. Genetic relationship between porcine rotavirus strains bearing a new P-type. *Veterinary Microbiology*, v.125, n.1-2, p.193-195, 2007.

Parra, G.I.; Vidales, G.; Gomez, J.A.; Fernandez, F.M.; Parreño, V.; Bok, K. Phylogenetic analysis of porcine rotavirus in Argentina: Increasing diversity of G4 strains and evidence of interspecies transmission. *Veterinary Microbiology*, v.126, p.243-250, 2008.

Rácz, M.L.; Kroeff, S.S.; Munford, V.; Caruzo, T.A.R.; Durigon, E.L.; Hayashi, Y.; Gouvea, V.; Palombo, E.A. Molecular Characterization of Porcine Rotaviruses from the Southern Region of Brazil: Characterization of an Atypical Genotype G [9] Strain. *Journal of Clinical Microbiology*, v.38, n.6, p.2443-2446, 2000.

Ruiz, A.M.; Lopez, I.V.; Lopez, S.; Espejo, R.T.; Arias, C.F. Molecular and antigenic characterization of porcine rotavirus YM, a possible new rotavirus serotype. *Journal of Virology*, v.62, n.11, p.4331-4336, 1988.

Santos, N.; Lima, R.C.C.; Nozawa, C.M.; Linhares, R.E.; Gouvea, V. Detection of porcine rotavirus type G9 and of a mixture of types G1 and G5 associated with Wa-like VP4 specificity: evidence for natural human-porcine genetic reassortment. *Journal of Clinical Microbiology*, v.37, n.8, p.2734-2736, 1999.

Schumann, T.; Hotzel, H.; Otto, P.; Johne, R. Evidence of interspecies transmission and reassortment among avian group A rotaviruses. *Virology*, v.386, n.2, p.334-343, 2009.

Solberg, O.D.; Hasing, M.E.; Trueba, G.; Eisenberg, J.N. Characterization of novel VP7, VP4, and VP6 genotypes of a previously untypeable group A rotavirus. *Virology*, v.385, n.1, p.58-67, 2009.

Steyer, A.; Poljsak-Prijatelj, M.; Barlic-Maganja, D.; Marin, J. Human, porcine and bovine rotaviruses in Slovenia: evidence of interspecies transmission and genome reassortment. *Journal of General Virology*, v.89, p.1690-1698, 2008.

Stupka, J.A.; Carvalho, P.; Amarilla, A.A.; Massana, M.; Parra, G.I. National Rotavirus Surveillance in Argentina: High incidence of G9P[8] strains and detection of G4P[6] strains with porcine characteristics. *Infection, Genetics and Evolution*, v.9, p.1225-1231, 2009.

Tamehiro, C.Y.; Alfieri, A.F.; Médici, K.C.; Alfieri, A.A. Segmented double-stranded genomic RNA viruses in faecal samples from broiler chicken. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.34, p.349-353, 2003.

Teodoroff, T.A.; Tsunemitsu, H.; Okamoto, K.; Katsuda, K.; Kohmoto, M.; Kawashima, K.; Nakagomi, T.; Nakagomi, O. Predominance of Porcine Rotavirus G9 in Japanese Piglets with Diarrhea: Close Relationship of their VP7 Genes with those of Recent Human G9 Strains. *Journal of Clinical Microbiology*, v.43, n.3, p.1377-1384, 2005.

Tsai, C-H.; Chiu, H-H.; Abe, T. Epidemiologic features of rotavirus infection in Taiwan: A review. *Pediatrics International*, v.42, p.411-414, 2000.

Tsugawa, T.; Hoshino, Y. Whole genome sequence and phylogenetic analyses reveal human rotavirus G3P[3] strains Ro1845 and HCR3A are examples of direct virion transmission of canine/feline rotaviruses to humans. *Virology*, v.380, p.344-353, 2008.

Ursu, K.; Kisfali, P.; Rigó, D.; Ivanics, E.; Erdélyi, K.; Dán, Á.; Meleg, B.; Martella, V.; Bányai, K. Molecular analysis of the VP7 gene of pheasant rotaviruses identifies a new genotype, designated G23. *Archives of Virology*, v.154, p.1365-1369, 2009.

Winiarczyk, S.; Paul, P.S.; Mummidi, S.; Panek, R.; Gradzki, Z. Survey of porcine rotavirus G and P genotype in Poland and the United States using RT-PCR. *Journal of Veterinary Medicine B*, v.49, p.373-378, 2002.

Wittum, T.E.; Dewey, C.E.; Hurd, H.S.; Dargatz, D.A.; Hill, G.W. Herd and litter- level factors associated with the incidence of diarrhea morbidity and mortality in piglets 1- 3 days of age. *Journal of Swine Health and Production*, v.3, p.99-104, 1995.

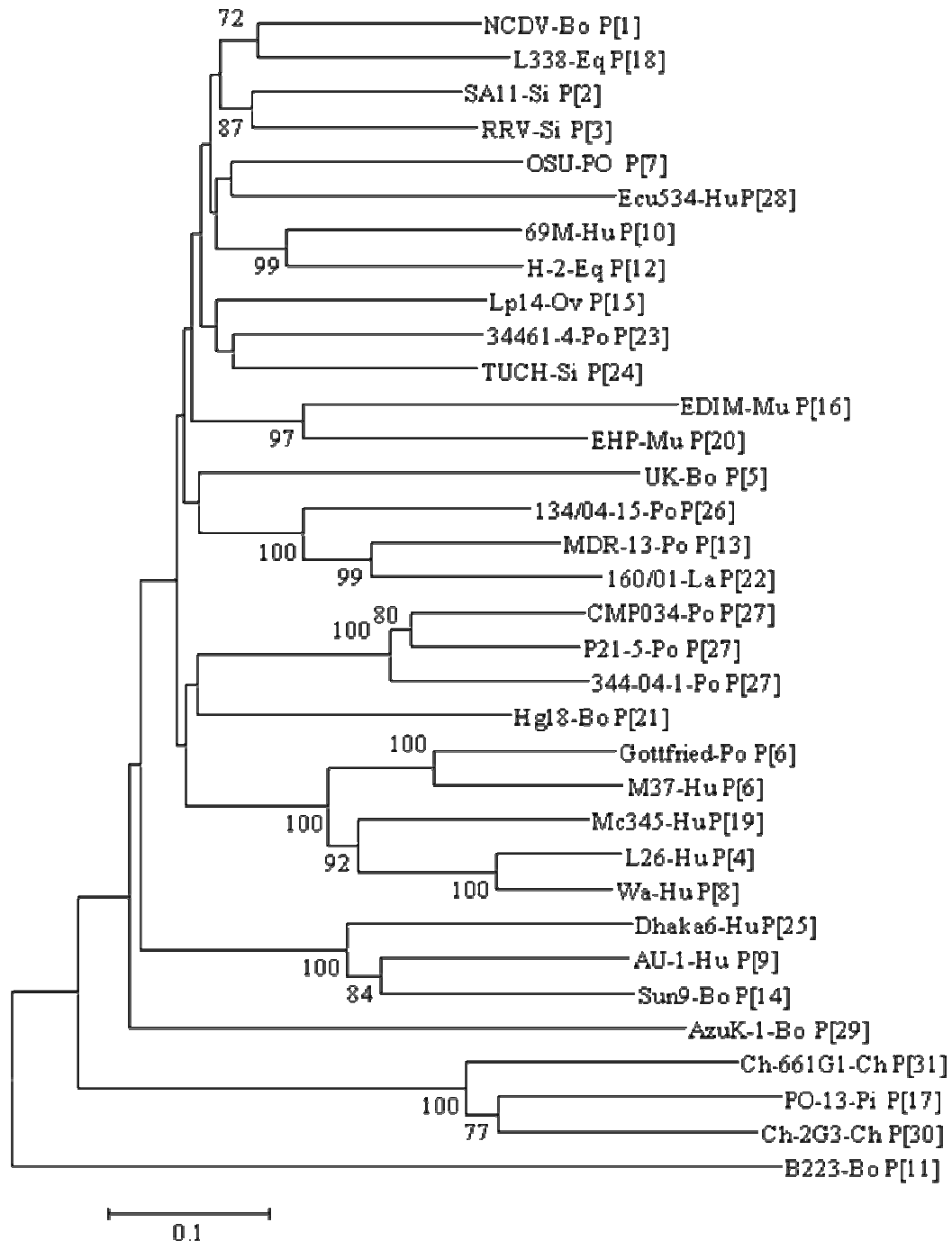
Zlotowski, P.; Driemeier, D.; Barcellos, D.E.S.N. Pathogenesis of diarrhoea in pigs: models and examples. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.36, (Suppl 1): s.81-86, 2008.

4 CONCLUSÕES

- A RT-PCR com *primers* consensuais para o gene VP4 possibilitou a amplificação de um produto com 876 pb em todas as 20 amostras de PoRV-A incluídas nesse estudo;
- Em nenhuma das amostras de PoRV-A foi possível a amplificação do genotipo P[6], linhagem II (Gottfried-like) característico de estirpes de RV-A de origem suína;
- Em todas as amostras de PoRV-A avaliadas, a genotipagem realizada por multiplex-*nested-PCR* utilizando *pools primers* genotipos-específicos gerou *amplicons* com 267 pb, referente ao produto esperado para o *primer* 3T-1, específico para o genotipo P[6] linhagem I presente em estirpes de RV-A de origem humana;
- As análises das sequências de nucleotídeos de produtos com 586 pb do gene VP4 e a reconstrução da árvore filogenética realizada em quatro estirpes de PoRV-A genotipo P[6] linhagem I (M-37-like) permitiu a caracterização das sublinhagens sendo duas estirpes virais classificadas como P[6]-Ie e outras duas como P[6]-If;
- A identificação dos genotipos P[6]-Ie e P[6]-If, recentemente descritos em estirpes de HuRV-A, em amostras de RV-A identificadas em um foco de diarreia neonatal suína ratifica a possibilidade de transmissão interespecies;
- Rebanhos suínos regularmente vacinados com a estirpe PoRV-A Gottfried são susceptíveis à infecção e ao desenvolvimento de diarreia ocasionada pela estirpe PoRV-A M37-like.

ANEXOS

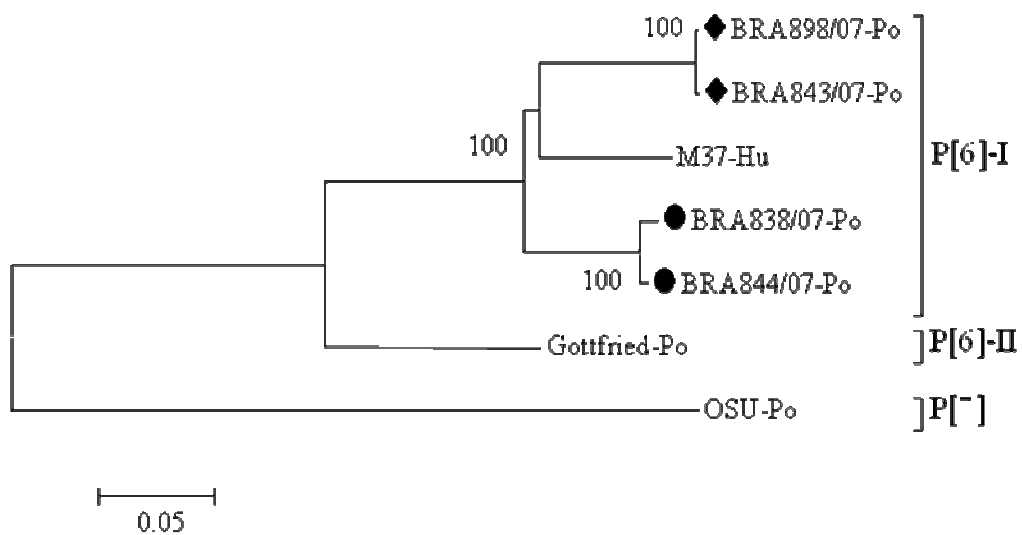
ANEXO A –



Reconstrução da árvore filogenética baseada em sequências parciais com 830 nt (37-866 nt) nucleotídeos do gene VP4 do RV-A pertencentes aos protótipos dos P genótipos descritos. As sequências VP4 do RV-A (e seus números de acesso no *GenBank*) são as seguintes: NCDV (AB119636), SA11 (M23188), RRV (M18736), L26 (M58292), UK (M22306), Gottfried (M33516), M37 (L20877), OSU (X13190), Wa (L34161), AU1 (D10970), 69 M (M60600), B223 (D13394), H-2 (L04638), MDR13 (L07886), Sun9 (AB158430), Lp14 (L11599), EDIM

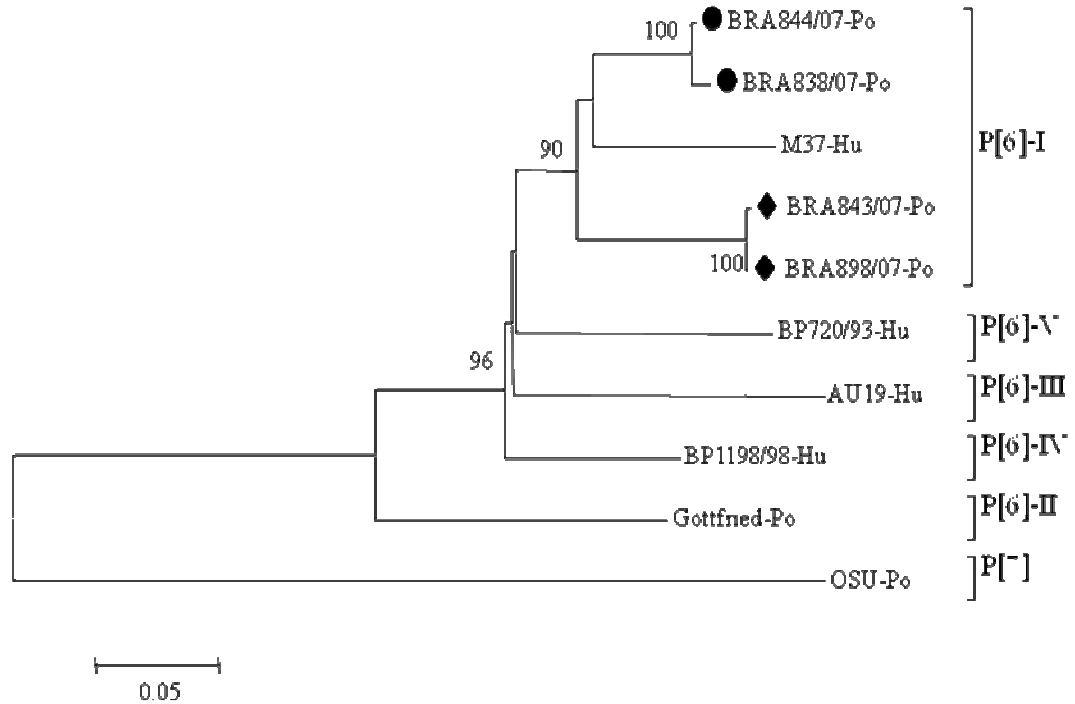
(AF039219), PO-13 (AB009632), L338 (D13399), Mc345 (D38054), EHP (U08424), Hg18 (AF237665), 160/01 (AF526374), 34461-4 (AY768809), TUCH (AY596189), Dhaka6 (AY773004), 134/04-15 (DQ061053), CMP034 (DQ534016), P21-5 (DQ629926), 344-04-1 (DQ242615), Ecu534 (EU805773), AzuK-1 (AB454420), Ch-2G3 (EU486956), Ch-661G1 (EU486962). Abreviações: Bo, bovino; Ch, frango; Eq, equino; Hu, humano; Mu, murino; Ov, ovino; Pi, pombo; Po, suíno; Si, símio.

ANEXO B-



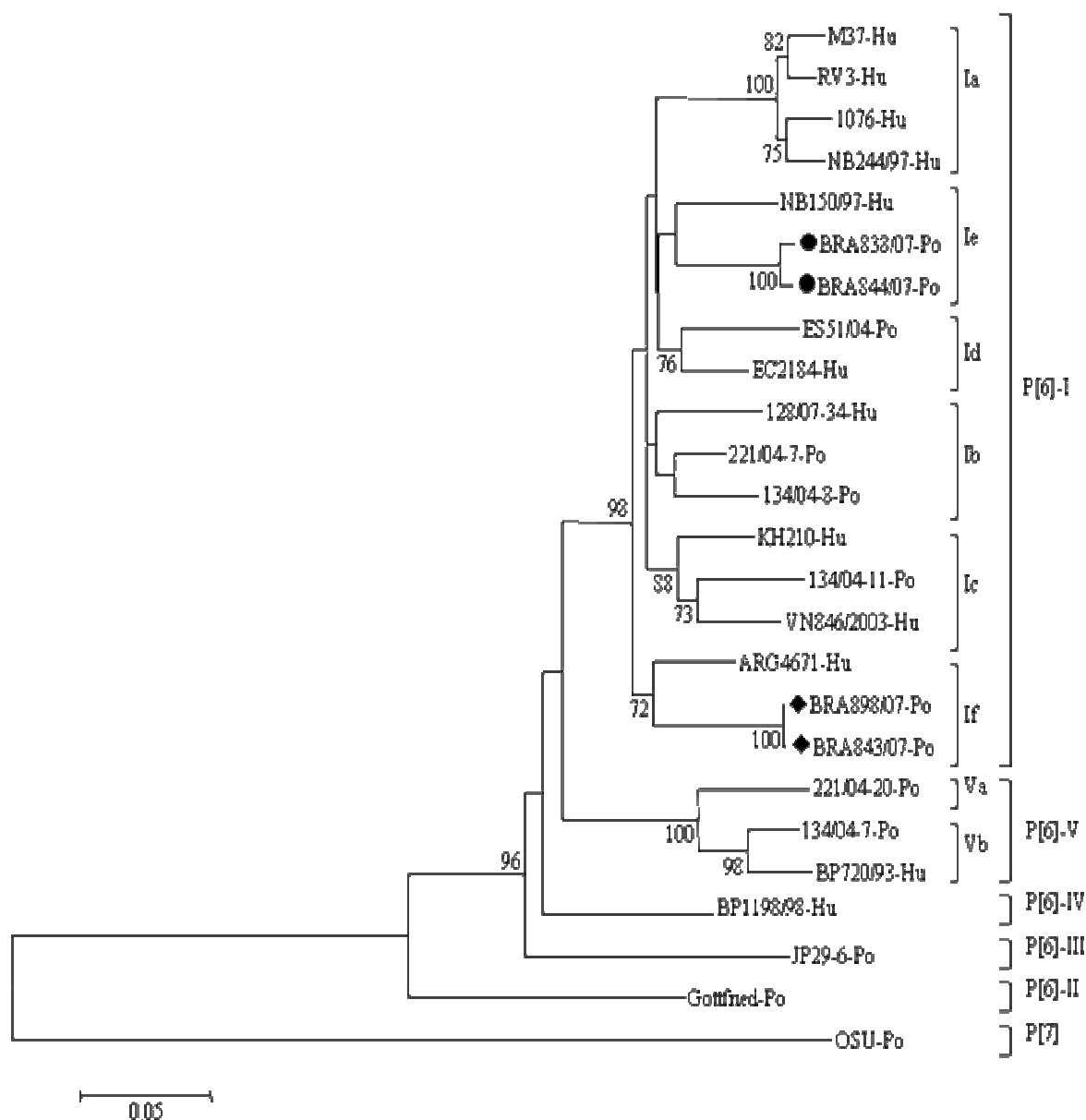
Reconstrução da árvore filogenética baseada em sequências parciais com 689 nt (103-791 nt) nucleotídeos do gene VP4 do RV-A pertencentes ao genótipo P[6], incluindo as estirpes descritas neste estudo. As sequências parciais do gene VP4 do RV-A e os números de acesso no *GenBank* são os seguintes: M37 (L20877), Gottfried (M33516), OSU (X13190)-*outgroup*. Abreviações: Hu, humano; Po, suíno.

ANEXO C –



Reconstrução da árvore filogenética com estirpes descritas neste estudo baseada em sequências parciais com 505 nt (200-704 nt) nucleotídeos do gene VP4 do RV-A pertencentes ao genótipo P[6], demonstrando a presença das linhagens. As sequências parciais do gene VP4 do RV-A e os números de acesso no *GenBank* são os seguintes: M37 (L20877), Gottfried (M33516), AU19 (AB017917), BP1198/98 (AJ621504), BP720/93 (AJ621503), OSU (X13190)-*outgroup*. Abreviações: Hu, humano; Po, suíno.

ANEXO D –



Reconstrução da árvore filogenética incluindo estirpes descritas neste estudo, baseada em sequências parciais com 587 nt (111-697 nt) nucleotídeos do gene VP4 do RV-A pertencentes ao genótipo P[6], demonstrando a presença das linhagens e sublinhagens. As sequências parciais do gene VP4 do RV-A e os números de acesso no *GenBank* são os seguintes: M37 (L20877), RV3 (U16299), 1076 (M88480), NB244/97 (DQ822476), 128/07-34 (EU734175), 221/04-7 (AY955303), 134/04-8 (AY955301), VN846/2003 (EF179117), 134/04-11 (AY955300), KH210 (AB271687), ES51/04 (AY955306), EC2184 (GQ149094), NB150/97 (DQ299877), ARG4671 (FJ712691), Gottfried (M33516), JP29-6 (AB176688), BP1198/98 (AJ621504), 221/04-20 (AY955308), 134/04-7 (AY955310), BP720/93 (AJ621503), OSU (X13190)-*outgroup*. Abreviações: Hu, humano; Po, suíno.

ANEXO E –

Matriz de identidade parcial do gene VP8* 586 nt (111-696 nt) de novas estirpes genotipo P[6] com representantes das linhagens e sublinhagens do RV-A.

Strain	M37-HU/Ia	134/04-8-PO/Ib	128/07-34-HU/Ib	134/04-11-PO/Ic	KH210-HU/Ic	ES51/04-PO/Id	EC2184-HU/Id	NB150/97-HU/Ie	ARG4671-HU/If	Gottfried-PO/II
M37-HU/Ia	ID	0,903	0,891	0,881	0,893	0,89	0,91	0,905	0,902	0,783
134/04-8-PO/Ib	0,903	ID	0,931	0,898	0,92	0,908	0,92	0,919	0,914	0,802
128/07-34-HU/Ib	0,891	0,931	ID	0,9	0,922	0,907	0,922	0,912	0,915	0,805
134/04-11-PO/Ic	0,881	0,898	0,9	ID	0,932	0,893	0,902	0,9	0,908	0,8
KH210-HU/Ic	0,893	0,92	0,922	0,932	ID	0,915	0,92	0,915	0,917	0,809
ES51/04-PO/Id	0,89	0,908	0,907	0,893	0,915	ID	0,931	0,905	0,9	0,805
EC2184-HU/Id	0,91	0,92	0,922	0,902	0,92	0,931	ID	0,929	0,92	0,802
NB150/97-HU/Ie	0,905	0,919	0,912	0,9	0,915	0,905	0,929	ID	0,905	0,804
ARG4671-HU/If	0,902	0,914	0,915	0,908	0,917	0,9	0,92	0,905	ID	0,804
Gottfried-PO/II	0,783	0,802	0,805	0,8	0,809	0,805	0,802	0,804	0,804	ID
JP29-6-PO-III	0,81	0,836	0,838	0,824	0,829	0,836	0,824	0,831	0,831	0,783
BP1198/98-HU/IV	0,838	0,864	0,879	0,848	0,865	0,859	0,869	0,857	0,871	0,802
221/04-20-PO/Va	0,833	0,843	0,852	0,841	0,852	0,836	0,847	0,847	0,857	0,795
134/04-7-PO/Vb	0,835	0,855	0,864	0,857	0,85	0,841	0,848	0,84	0,859	0,786
BP720/93-HU/Vb	0,831	0,843	0,855	0,848	0,841	0,836	0,85	0,838	0,853	0,786
BRA838/07-Po	0,89	0,902	0,902	0,9	0,912	0,898	0,919	0,924	0,915	0,786
BRA844/07-Po	0,89	0,902	0,902	0,9	0,912	0,902	0,915	0,92	0,915	0,788
BRA843/07-Po	0,886	0,895	0,9	0,888	0,908	0,89	0,895	0,891	0,924	0,79
BRA898/07-Po	0,884	0,896	0,902	0,89	0,91	0,891	0,896	0,893	0,922	0,792
OSU-Po	0,592	0,576	0,578	0,564	0,564	0,583	0,587	0,587	0,571	0,595

continuação:

JP29-6-PO-III	BP1198/98-HU/IV	221/04-20-PO/Va	134/04-7-PO/Vb	BP720/93-HU/Vb	BRA838/07-Po	BRA844/07-Po	BRA843/07-Po	BRA898/07-Po	OSU-Po
0,81	0,838	0,833	0,835	0,831	0,89	0,89	0,886	0,884	0,592
0,836	0,864	0,843	0,855	0,843	0,902	0,902	0,895	0,896	0,576
0,838	0,879	0,852	0,864	0,855	0,902	0,902	0,9	0,902	0,578
0,824	0,848	0,841	0,857	0,848	0,9	0,9	0,888	0,89	0,564
0,829	0,865	0,852	0,85	0,841	0,912	0,912	0,908	0,91	0,564
0,836	0,859	0,836	0,841	0,836	0,898	0,902	0,89	0,891	0,583
0,824	0,869	0,847	0,848	0,85	0,919	0,915	0,895	0,896	0,587
0,831	0,857	0,847	0,84	0,838	0,924	0,92	0,891	0,893	0,587
0,831	0,871	0,857	0,859	0,853	0,915	0,915	0,924	0,922	0,571
0,783	0,802	0,795	0,786	0,786	0,786	0,788	0,79	0,792	0,595
ID	0,847	0,821	0,835	0,826	0,855	0,855	0,835	0,836	0,583
0,847	ID	0,85	0,853	0,843	0,872	0,876	0,86	0,862	0,595
0,821	0,85	ID	0,919	0,924	0,841	0,838	0,857	0,857	0,575
0,835	0,853	0,919	ID	0,957	0,85	0,855	0,857	0,857	0,575
0,826	0,843	0,924	0,957	ID	0,843	0,847	0,847	0,847	0,581
0,855	0,872	0,841	0,85	0,843	ID	0,989	0,881	0,883	0,585
0,855	0,876	0,838	0,855	0,847	0,989	ID	0,888	0,89	0,585
0,835	0,86	0,857	0,857	0,847	0,881	0,888	ID	0,998	0,573
0,836	0,862	0,857	0,857	0,847	0,883	0,89	0,998	ID	0,573
0,583	0,595	0,575	0,575	0,581	0,585	0,585	0,573	0,573	ID

Número de acesso (*GenBank*): M37 (L20877), 128/07-34 (EU734175), 134/04-8 (AY955301), 134/04-11 (AY955300), KH210 (AB271687), ES51/04 (AY955306), EC2184 (GQ149094), NB150/97 (DQ299877), ARG4671 (FJ712691), Gottfried (M33516), JP29-6 (AB176688), BP1198/98 (AJ621504), 221/04-20 (AY955308), 134/04-7 (AY955310), BP720/93 (AJ621503), OSU (X13190)-*outgroup*. Abreviações: Hu, humano; Po, suíno.

ANEXO F –

Porcentagem da distância de nucleotídeos (111-693 nt) entre linhagens e sublinhagens do RV-A genótipo P[6]^a.

Linhagens e Sublinhagens	Ia	Ib	Ic	Id	Ie	If	II	III	IV	Va	Vb	BRA838/07- Po	BRA898/07- Po	BRA844/07- Po	BRA843/07- Po
Ia	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Ib	10.4 ^b	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Ic	11.81	8.36	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Id	11.96	8.81	9.5	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Ie	11.58	9.75	10.14	10.66	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
If	10.62	7.75	8.38	9.75	9.66	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
II	27.125	23.25	23.66	23.25	24.33	23.5	–	–	–	–	–	–	–	–	–
III	23.43	19.62	20.33	19.62	18.66	19.5	27	–	–	–	–	–	–	–	–
IV	18.08	14.41	16.25	15.5	16	15.33	23.66	17.33	–	–	–	–	–	–	–
Va	19.58	17.25	17.48	18.75	17.55	15.5	25	21.33	16.66	–	–	–	–	–	–
Vb	20.7	17.07	17.79	18.64	18.09	16.92	25.42	20.42	18.04	9.04	–	–	–	–	–
BRA838/07-Po	12.75	10.5	10.44	10.5	7.66	8.5	26	17	14.66	18	18.14	–	–	–	–
BRA844/07-Po	12.625	10.5	10.44	10	8.66	9	26	17	14	19	17.71	1	12	–	–
BRA898/07-Po	13.75	10	11	11.75	13	8	25	19	16	16	17.71	13	–	–	–
BRA843/07-Po	13.75	10.75	11.44	12	13	8	25	19.5	16	16	17.71	13	0	13	–

a Porcentagens de distâncias são expressas em valores médios.

b Distância entre sublinhagens estão em negrito.

Número de acesso (*GenBank*): NB244/97 (DQ822476), MW23 (AJ278253), HST369/99 (DQ525200), US1205 (AF079356), 1076 (M88480), RV3 (U16299), ST3 (L33895), M37 (L20877), ES51/04 (AY955306), ES51/03 (AY955305), ES51/02 (AY955304), EC2184 (GQ149094), NB150/97 (DQ299877), HST034/98 (DQ525196), COD055/91 (DQ525192), LL4260 (EF159568), VN846/2003 (EF179117), KH210 (AB271687), KH228 (AB271688), VN904/2003 (EF179118), LL36755 (EF159569), LL3354 (EF159567), 134/04-10 (AY955299), 134/04-11 (AY955300), 128/07-34 (EU734175), 134/04-8 (AY955301), 221/04-7 (AY955303), 221/04-13 (AY955302), Arg4605 (FJ712690), Arg4671 (FJ712691), 221/04-19 (AY955307), 221/04-20 (AY955308), 221/04-21 (AY955309), 134/04-7 (AY955310), BP1227/02 (AJ621505), SI-MB6 (EU348716), SI-P83 (EU348718), SI-P14-3 (EU348717), BP1231/02 (AJ621506), BP720/93 (AJ621503), BP1198/98 (AJ621504), BP1338/00 (AJ621507), BP271/00 (AJ621502), JP3-6 (AB176685), JP29-6 (AB176688), Gottfried (M33516), Mc345 (D38054)-outgroup.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Lista de Reagentes

1. 100 mM dNTP *Set*, 4 x 250 µL; 25 µmol cada (100 mM dATP *Solution*, 100 mM dCTP *Solution*, 100 mM dGTP *Solution*, 100 mM dTTP *Solution*) (*Invitrogen™ Life Technologies, EUA*)
2. 10 x PCR-*Buffer* (200 mM Tris-HCl, pH 8,4, 500 mM KCl) (*Invitrogen™ Life Technologies, EUA*)
3. 123 bp DNA *Ladder* (*Invitrogen™ Life Technologies, EUA*)
4. 2-Mercaptoetanol (C₂H₆O₅) P.M. 78,13 (Fluka®)
5. Acetona P.A. (CH₃COCH₃) P.M. 58,08 (Dinâmica®)
6. Ácido acético glacial P.A. (CH₃COOH) P.M. 60,05 (Nuclear®)
7. Ácido bórico (H₃BO₃) P.M. 61,83 (Sicalab®)
8. Ácido clorídrico (HCl) P.M. 36,46 (Reagen®)
9. Ácido etilenodiaminotetraácido sal di-sódico - EDTA P.A. (C₁₀H₁₄N₂O₈Na₂.2H₂O) P.M. 372,24 (Reagen®)
10. Acrilamida P.M. 71,08 (Gibco BRL®)
11. Agar Noble (Difco®)
12. Agarose (*Invitrogen™ Life Technologies, EUA*)
13. Álcool etílico absoluto (C₂H₂OH) P.M. 46,07 (Nuclear®)
14. Álcool isoamílico ((CH₃)₂CHCH₂CH₂OH) P.M. 88,15 (Synth®)
15. Azul de bromofenol (Sigma®, EUA)
16. Bicarbonato de sódio P.A. (NaHCO₃) P.M. 84,01 (Biotec®)
17. Bis-acrilamida P.M. 154,2 (Sigma®, EUA)
18. Borohidreto de sódio P.M. 37,83 (Sigma®, EUA)
19. Brometo de etídeo (C₂₁H₂₀N₃Br) P.M. 394,3 (Sigma®, EUA)
20. Cloreto de Cálcio Puro (CaCl₂) P.M. 110,94 (*Invitrogen™ Life Technologies, EUA*)
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. (CHCl₃) P.M. 119,38 (Dinâmica®)
24. Dióxido de sílica (SiO₂) P.M. 60,08 (Sigma®, EUA)
25. Dodecil Sulfato de Sódio - Lauril Sulfato de Sódio - SDS (C₁₂H₂₅NaO₄S) P.M. 288,38 (BDH)
26. Fosfato de sódio dibásico anidro (Na₂HPO₄) P.M. 141,96 (Synth®)

27. Fosfato de sódio monobásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) P.M. 155,99 (Reagen®)
28. Glicina P.A. P.M. 75,07 (Nuclear®)
29. Glicose $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ P.M. 180,16 (Reagen®)
30. Hidróxido de Sódio P.A. (NaOH) P.M. 40,00 (*Mallinckrodt Chemicals*®)
31. Hidroximetil amino metano - TRIS 99% P.M. 121,14 (Merck)
32. Isotiocianato de guanidina P.M. 118,16 (*InvitrogenTM Life Technologies, EUA*)
33. Metanol, P.A. (CH_3OH) P.M. 32,04 (Allkimia®)
34. *Platinum Taq DNA Polymerase recombinant* 500 unidades (*InvitrogenTM Life Technologies, BRA*)
35. Sacarose, P.A. - sucrose ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$) P.M. 342,31 (Reagen®)
36. *Superscript TM II RNase H - Reverse Transcriptase* – 200 unidades/ μL (*InvitrogenTM Life Technologies, EUA*)
37. Triton x-100 (J.T.Baker®)

APÊNDICE B – Soluções e Tampões

- **Hidratação da sílica**

- 60 g de sílica (O_2Si)
- Adicionar 500 mL de água MilliQ autoclavada
- Agitar lentamente e manter em repouso durante 24 horas
- Por sucção, desprezar 430 mL do sobrenadante
- Ressuspender a sílica em 500 mL de água bidestilada
- Manter em repouso durante 5 horas para sedimentar
- Desprezar 440 mL do sobrenadante
- Adicionar 600 μ L de HCl (32% w/v) para ajustar o pH=2,0)
- Aliquotar e autoclavar

- **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 x-100

- **Solução L2**

- 120 g de isotiocianato de guanidina (GUSCN)
- 100 mL de TRIS-HCl 0,1 M pH 6,4

- **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 MilliQ 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 de TRIS-HCL 0,5M

- 6 g uréia
- Água MilliQ q.s.p. 20 mL

- **Tampão de corrida: TBE (TRIS - Ácido bórico - EDTA) 10 x []**
 - 107,78 g TRIS (0,89 M)
 - 55,03 g de ácido bórico (0,89 M)
 - 7,45 g de EDTA (0,02 M)
 - Água bidestilada q.s.p. 1 litro

- **Tampão de corrida para PAGE**
 - 30 g TRIS (0,24 M)
 - 14,4 g de ácido aminoacético (glicina) (NH₂CH₂COOH) (0,19M)
 - Água MilliQ q.s.p. 1L

- **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 MilliQ autoclavada q.s.p. 1L

- **Fenol/clorofórmio-álcool isoamílico**
 - 25 mL fenol saturado
 - 24 mL clorofórmio
 - 1 mL álcool isoamílico

- **SDS 10%**
 - 5 g de dodecil sulfato de sódio - Lauril sulfato de sódio - SDS (C₁₂H₂₅NaO₄S)
 - Água MilliQ autoclavada q.s.p. 50 mL

- **Lower TRIS pH 8,8 para PAGE**
 - 36,34 g TRIS (1,5M)
 - Água MilliQ q.s.p. 200 mL

- **Upper TRIS pH 6,8 para PAGE**
 - 12,12 g TRIS (0,5M)
 - Água MilliQ q.s.p 200 mL

- **Solução Acrilamida / Bisacrilamida**
 - 1,3 g bisacrilamida
 - 50 g acrilamida
 - Água MilliQ q.s.p 100 mL

- **Solução fixadora para PAGE**
 - 30 mL álcool etílico absoluto
 - 1,5 mL ácido acético
 - Água MilliQ q.s.p. 300 mL

- **Solução de prata para PAGE**
 - 0,55 g de nitrato de prata
 - Água MilliQ 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 MilliQ q.s.p. 300 mL

- **Solução stop da coloração para PAGE**
 - 15 mL ácido acético P.A.
 - Água MilliQ q.s.p. 300 mL

- **Solução conservadora para PAGE**
 - 15 mL álcool etílico P.A.
 - Água MilliQ q.s.p. 300 mL

- **Gel inferior (7,5%) da PAGE**
 - 5 mL Lower TRIS
 - 3 mL acrilamida/Bisacrilamida
 - 50 µL TEMED
 - 0,56 mL persulfato de amônio 2%
 - 11,44 mL água bidestilada

- **Gel superior (3,5%) da PAGE**
 - 2,5 mL Upper TRIS
 - 0,7 mL acrilamida/bisacrilamida
 - 50 µL TEMED
 - 0,60 mL persulfato de amônio 2%
 - 6,20 mL água bidestilada

- **Gel de agarose 2%**
 - 1 g agarose
 - 50 mL de tampão TEB 1x
 - 30 µL de brometo de etídio

- **Diluição de dNTP**
 - solução estoque - concentração 100 mM - 100 µl de cada dNTP
 - solução uso - concentração 10 mM - 10 µl da solução estoque + 90 µl de água MilliQ autoclavada

APÊNDICE C – Protocolo de Técnicas

- **Suspensão fecal - Extração bruta**

- 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 RNA: Associação das técnicas fenol/clorofórmio-álcool isoamílico e sílica/isotiocianato de guanidina**

- 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 µL 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
- Adicionar 500 µL da solução L6
- Adicionar 25 µL 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 µL de solução L2
- Homogeneizar em vórtex
- Centrifugar 10.000 x g /30 s
- Desprezar o sobrenadante em solução contendo NaOH 10M

- Adicionar 500 μ L de solução L2
- Homogeneizar em vórtex
- Centrifugar 10.000 x g /30 s
- Desprezar o sobrenadante em solução contendo NaOH 10M
- Adicionar 500 μ L de etanol 70% gelado
- Homogeneizar em vórtex
- Centrifugar 10.000 x g /30 s
- Desprezar sobrenadante em descarte comum
- Adicionar 500 μ L de etanol 70% gelado
- Homogeneizar em vórtex
- Centrifugar 10.000 x g /30 s
- Desprezar sobrenadante em descarte comum
- Adicionar 1000 μ L de acetona P.A. gelada
- Homogeneizar em vórtex
- Centrifugar 10.000 x g /30 s
- Desprezar sobrenadante em descarte comum
- Secar o *pellet* 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

Quadro 1. Primers consensuais - gene VP4 (P tipo) de RV-A

Genotipo	Primer	Sequência	Posição/polaridade	Produto	Referência
P	con3	TGGCTTCGCTCATTTATAGACA	11-32 (+)		(1)
	con2	ATTTCGGACCATTATAACC	868-887 (-)	876pb	(1)

(1) Gentsch et al., 1992.

Quadro 2. Primers genotipagem P tipos mais encontrados em estirpes de RV-A de origem humana

Genotipo	Primer	Sequência	Posição/polaridade	Produto	Referência
P	con3	TGGCTTCGCTCATTTATAGACA	11-32 (+)		(1)
P[4]	2T-1	CTATTGTTAGAGGTTAGAGTC	494-474 (-)	483pb	(1)
P[6]	3T-1	TGTTGATTAGTTGGATTCAA	278-259 (-)	267pb	(1)
P[8]	1T-1	TCTACTTGGATAACGTGC	356-339 (-)	345pb	(1)
P[9]	4T-1	TGAGACATGCAATTGGAC	402-385 (-)	391pb	(1)

(1) Gentsch et al., 1992.

Quadro 3. Primers genotipagem P tipos mais encontrados em estirpes de RV-A de origem animal

Genotipo	Primer	Sequência	Posição/polaridade	Produto	Referência
P	con2	ATTTCGGACCATTATAACC	887-868 (-)		(1)
P[1]	pNCDV	CGAACGCGGGGGTGGTAGTTG	269-289(+)	622pb	(2)
P[5]	pUK	GCCAGGTGTCGCATCAGAG	336-354(+)	552pb	(2)
P[6]	pGott	GCTTCAACGTCCTTAACATCAG	465-487(+)	423pb	(2)
P[7]	pOSU	CTTTATCGGTGGAGAATACGTCAC	389-412(+)	502pb	(2)
P[11]	pB223	GGAACGTATTCTAATCCGGTG	574-594(+)	314pb	(2)

(1) Gentsch et al., 1992.

(2) Gouvea et al., 1994a.

- **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
Àgua - 3 µL
Volume final - 5 µL

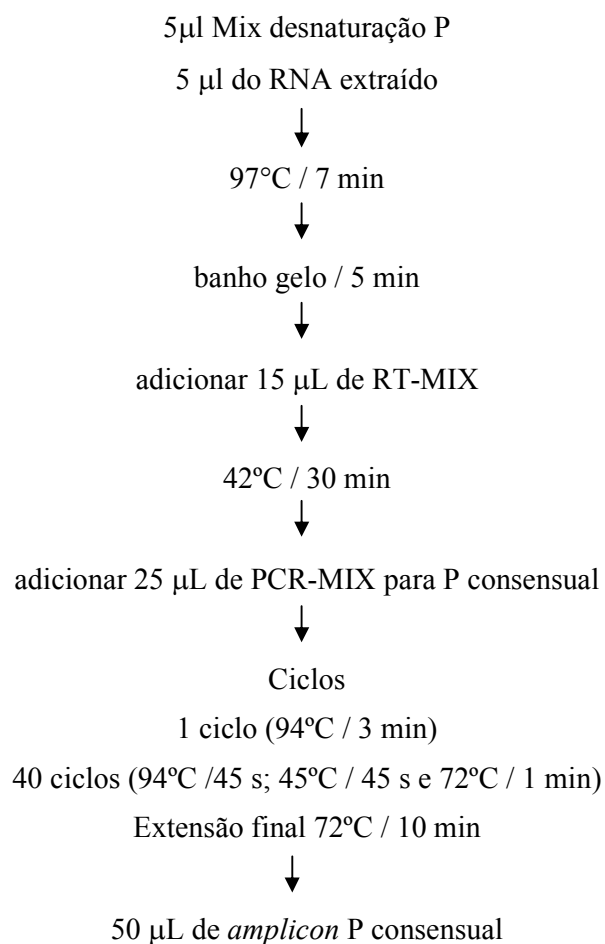
- Mix Transcrição Reversa (RT-MIX)

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

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

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

Esquema da RT-PCR para genotipo P (consensual)



- **Multiplex-nested-PCR**

- **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

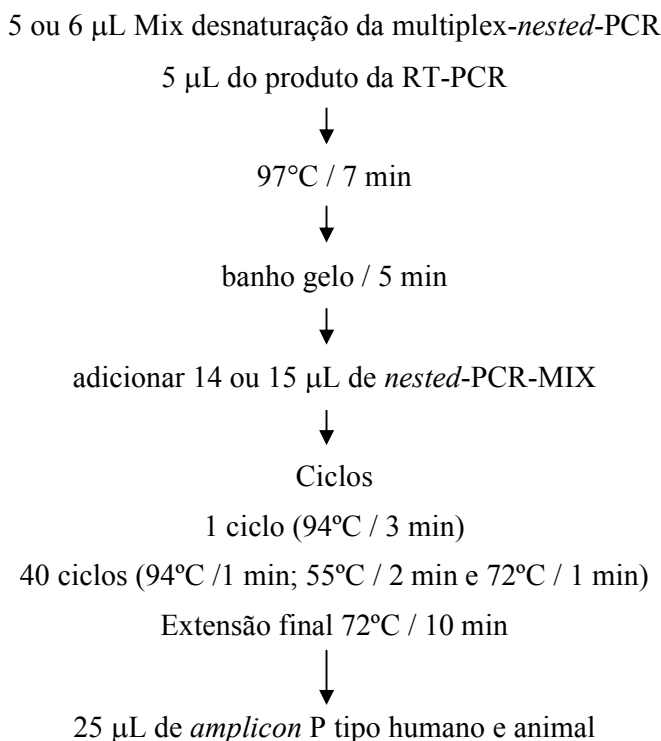
- Mix desnaturação

Mix Desnaturação 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 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>Platinun®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 tipo animal) 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 2%**

- 1 g de agarose
- 50 mL TEB *buffer* (Tris 89mM; ácido bórico 89 mM; EDTA 2mM) pH 8,4
- 30 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 μL 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 16.000 x g/30s
5. Transferir 600 μL 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 16.000 x g/30s
 8. Descartar o filtrado e recolocar a coluna no mesmo tubo.
 9. Adicionar 500 μ L do *Wash buffer type 1* na coluna com tubo coletor
 10. Centrifugar a 16.000 x g/30s
 11. Descartar o filtrado e transferir a coluna para um microtubo de 1,5 mL.
 12. Adicionar 30 μ L do *Elution buffer type 6*
 13. Incubar a temperatura ambiente por 1 min.
 14. Centrifugar a 16.000 x g/1 min.
 15. Estocar o DNA purificado em -20°C.
- **Quantificação de produto de PCR**
 1. Preparar a solução *Quant-iTTM Working Solution* diluindo o reagente *Quant-iTTM* no *Buffer Quant-iTTM*, 1:200. São necessários 200 μ L desta solução por amostra e para os padrões 0 e 100.
 2. Homogeneizar em vórtex.
 3. No microtubo das amostras adicionar 198 μ L da solução *Quant-iTTM Working Solution* a 2 μ L do DNA purificado.
 4. No microtubo do padrão 0 adicionar 190 μ L da solução *Quant-iTTM Working Solution* a 10 μ L do padrão 0.
 5. No microtubo do padrão 100 adicionar 190 μ L da solução *Quant-iTTM Working Solution* a 10 μ L 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 *QubitTM fluorometer (InvitrogenTM Life Technologies, EUA)*
 9. Multiplicar pelo fator de diluição para determinar a concentração correta da amostra.