



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

BRUNA LETÍCIA DOMINGUES MOLINARI

**PRIMEIRA DESCRIÇÃO DE ROTAVÍRUS SUÍNO GRUPO H  
NO CONTINENTE AMERICANO**

---

Londrina  
2014

BRUNA LETÍCIA DOMINGUES MOLINARI

**PRIMEIRA DESCRIÇÃO DE ROTAVÍRUS SUÍNO GRUPO H  
NO CONTINENTE AMERICANO**

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

Orientador: Prof. Dr. Amauri Alcindo Alfieri.

Londrina  
2014

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

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

M722p	<p>Molinari, Bruna Letícia Domingues. Primeira descrição de rotavírus suíno grupo H no continente americano/ Bruna Letícia Domingues Molinari. – Londrina, 2014. 79 f. : il.</p> <p>Orientador: Amauri Alcindo Alfieri. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2014. Inclui bibliografia.</p> <p>1. Suíno – Doenças – Teses. 2. Diarreia em suínos – Teses. 3. Rotavirus – 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.</p> <p style="text-align: right;">CDU 619:636.4</p>
-------	--

BRUNA LETÍCIA DOMINGUES MOLINARI

**PRIMEIRA DESCRIÇÃO DE ROTAVÍRUS SUÍNO GRUPO H NO  
CONTINENTE AMERICANO**

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

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof. Dr. Amauri Alcindo Alfieri  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof. Dr. José Paulo Gagliardi Leite  
Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Alice Fernandes Alfieri  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 30 de abril de 2014.

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 a 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**

## **DEDICO**

---

À minha família.

## **AGRADECIMENTOS**

---

A Deus, por tudo.

Aos professores Amauri e Alice Alfieri, exemplos de dedicação, por todo seu carinho e paciência, pelos conhecimentos compartilhados e por terem aceitado me orientar durante essa jornada.

Aos professores que constituíram a banca de qualificação e defesa, Dr. Selwin Arlington Headley e Dr. José Paulo Gagliardi Leite.

À Universidade Estadual de Londrina e aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, pela formação acadêmica e científica.

Aos colegas e amigos de laboratório que sempre, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização e conclusão deste trabalho.

Aos amigos de longa data, pelo companheirismo, carinho, preocupação, pelas conversas, festas e risadas. Por tornarem minha vida mais alegre.

Aos meus pais, por sempre acreditarem em mim e me apoiarem em todas minhas decisões. Por sua dedicação e amor incondicional. Por serem exemplos a se seguir. Aos dois, minha admiração, respeito e amor.

Ao meu irmão, pelas conversas e beliscões. Com certeza minha vida não teria a mesma graça sem você!

À toda minha família, por seu amor e pela constante preocupação e torcida.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

**Muito obrigada!**

Que a felicidade não dependa do tempo, nem da paisagem, nem da sorte, nem do dinheiro. Que ela possa vir com toda simplicidade, de dentro para fora, de cada um para todos. Que as pessoas saibam falar, calar, e acima de tudo ouvir. Que tenham amor ou então sintam falta de não tê-lo. Que tenham ideais e medo de perdê-los. Que amem ao próximo e respeitem sua dor. Para que tenhamos certeza de que: “Ser feliz sem motivo é a mais autêntica forma de felicidade”.

Carlos Drummond de Andrade

MOLINARI, Bruna Letícia Domingues. **Primeira descrição de rotavírus suíno grupo H no continente americano**. 2014. 79 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2014.

### RESUMO

Na criação comercial de suínos a diarreia do pré e do pós-desmame dos leitões representa o principal problema sanitário nessas fases de criação. O rotavírus (RV) é um importante agente etiológico de gastroenterites virais em suínos lactentes e recém-desmamados. Dentre os sete grupos de RV (A-G), os grupos A, B e C determinam infecções que, por sua frequência, podem ser consideradas de importância epidemiológica para seres humanos e animais. Recentemente, com base na análise molecular do gene VP6, foi proposta a criação de um novo grupo de RV denominado grupo H (RVH). Entre os RVH descritos até o momento, somente as cepas J19 e B219 de origem humana já tiveram seus genomas completos determinados. Por sua vez, a única cepa de RVH detectada em suínos (SKA-1), apresenta apenas os genes VP4, VP6, VP7 e NSP4 caracterizados. Análises filogenéticas comparativas mostram que as cepas de RVH não se agrupam com nenhuma das espécies de RV já estabelecidas (RVA-RVG), no entanto, parecem estar relacionadas com os RVB. A epidemiologia e a caracterização antigênica e molecular do RVH, tanto de origem humana quanto suína permanecem pouco elucidadas. Os objetivos deste estudo foram descrever a primeira identificação de RVH em rebanho suíno brasileiro e caracterizar molecularmente a proteína VP6 das cepas virais encontradas. Três amostras fecais provenientes de um surto de diarreia em leitões lactentes e recém-desmamados ocorrido em uma granja do estado de Mato Grosso do Sul em 2012, inicialmente caracterizadas como RVB pelas técnicas de eletroforese em gel de poliacrilamida e RT-PCR, foram submetidas a novas amplificações por RT-PCR utilizando-se *primers* específicos para o gene da proteína NSP2 de RVB. Os produtos obtidos, menores do que o esperado, foram sequenciados e a análise filogenética revelou que as maiores identidades encontradas foram com o gene VP4 das cepas SKA-1, B219 e J19 pertencentes ao RVH. Para confirmar a similaridade das três amostras com RVH, uma nova série de RT-PCR foi realizada com *primers* selecionados para a amplificação do gene VP6 de RVH suíno a partir da sequência de nucleotídeos da cepa suína SKA-1. Na análise filogenética as três amostras brasileiras apresentaram maior similaridade com RVH, ficando agrupadas no mesmo cluster das cepas pertencentes a este grupo de RV. Em adição, similaridades relativamente altas foram encontradas entre as cepas de RVH suíno descritas nesse estudo e cepas de RVB e RVG. Os resultados encontrados confirmam a presença de RVH no Brasil e fornecem novos dados que auxiliarão no entendimento da filogenia e epidemiologia viral, bem como no esclarecimento dos padrões de evolução viral e propriedades biológicas do RVH. Esta é a primeira descrição de RVH suíno fora do continente asiático.

**Palavras-chave:** Suínos. Diarreia. Rotavirus grupo H. RVH. RT-PCR.

## ABSTRACT

---

MOLINARI, Bruna Letícia Domingues. **First description of porcine rotavirus group H in the American continent**. 2014. 79 p. Dissertation (Master in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2014.

### ABSTRACT

In commercial pig breeding, pre and post-weaning diarrhea represent the main health problem in these production stages. Rotavirus (RV) is an important cause of viral gastroenteritis in suckling and recently weaned pigs. Among the seven groups of RV (A-G), infections by groups A, B, and C are considered epidemiologically significant to humans and animals based on their frequency. Recently it was proposed the creation of a new RV group H (RVH) based on VP6 sequence analysis. Among the RVH described so far, complete nucleotide sequences have been determined only for the human strains J19 and B219. In addition, four genes encoding the proteins VP4, VP6, VP7, and NSP4 of the porcine RVH SKA-1 strain were determined. Comparative phylogenetic analysis showed that the RVH strains do not cluster together with any available sequences of members of the established RV groups (RVA-RVG), however, seem to be related to RVB. Very little molecular and epidemiologic information is available regarding this new RV group members of which infect both humans and piglets. The aims of this study were to describe the first identification of RVH in a Brazilian pig herd and to determine the VP6 nucleotide sequence of the detected strains. Three fecal samples collected during an outbreak of diarrhea in suckling and weaned piglets from a pig farm in Mato Grosso do Sul, 2012, initially characterized as RVB by polyacrilamide gel electrophoresis and RT-PCR were subjected to new RT-PCRs using specific primers for the amplification of RVB NSP2 gene. Shorter amplicons were generated for the 3 samples. Sequencing and similarity analyses showed that the highest nucleotide identities were obtained for the VP4 genes of the RVH strains SKA-1, B219, and J19. To confirm the similarity of the 3 samples with RV of group H, an addition set of RT-PCRs were performed using new primer pairs designed based on the complete sequence of the VP6 gene of the porcine RVH strain SKA-1. The phylogenetic analysis revealed that the 3 Brazilian samples shared the highest identities with RVH, grouping closest with the RVH strains in the phylogenetic tree. In addition, relatively high identities were found between the porcine RVH strains described in this study and RVB and RVG. These results confirm the presence of RVH in Brazil and provide new data that will assist in understanding the viral phylogeny and epidemiology, as well as the explanation of patterns of viral evolution and biological properties of RVH. This is the first description of porcine RVH outside the Asian continent.

**Keywords:** Pigs. Diarrhea. Group H rotavirus. RVH. RT-PCR.

### Revisão de Literatura

- Figura 1** – Eletroforese em gel de poliacrilamida mostrando os segmentos genômicos (dsRNA) do rotavírus (esquerda); as proteínas codificadas por cada segmento, sendo as proteínas estruturais denominadas VPs e as não-estruturais NSPs (centro), e uma ilustração simplificada da partícula viral e do seus componentes (direita) ..... 18
- Figura 2** – Eletroforese em gel de poliacrilamida mostrando a diferença de migração dos segmentos genômicos dos rotavírus do grupo E em relação aos outros grupos de rotavírus ..... 24
- Figura 3** – Análise comparativa do perfil eletroforético do novo rotavírus (NADRV) com a cepa ADRV (*Adult diarrhoea Rotavirus*) pertence aos rotavírus do grupo B ..... 25

### Rotavirus of species H detected in piglets with diarrhea in Brazil, 2012

- Figure** – Phylogenetic tree showing the inferred evolutionary relationships among representative rotavirus strains belonging to species A, B, C, D, F, G, and H, as well as the samples BR59, BR60, and BR63 based on an 1,197 bp fragment of the VP6 gene ..... 51

**Rotavirus of species H detected in piglets with diarrhea in Brazil, 2012**

**Tabela 1** – Oligonucleotide primers designed from the VP6 gene of the SKA-1 RV strain for RT-PCR sequence analysis ..... 49

**Tabela 2** – Identities of nucleotide and amino acid VP6 gene sequences (nt 24 to 1221) of the porcine rotavirus samples BR59, BR60, and BR63 compared with the VP6 sequences from representative RV strains of different species\* ..... 50

## LISTA DE QUADROS

---

### Revisão de Literatura

<b>Quadro 1</b> – Porcentagem de identidade de nucleotídeo para cada gene (ponto de corte) que define os genotipos para os 11 segmentos genômicos dos rotavírus do grupo A.....	20
---	----

<b>1</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	14
1.1	INTRODUÇÃO.....	15
1.2	ROTAVÍRUS.....	16
1.2.1	Taxonomia.....	17
1.2.1.1	Rotavírus grupo A (RVA).....	19
1.2.1.2	Rotavírus grupo B (RVB).....	21
1.2.1.3	Rotavírus grupo C (RVC).....	22
1.2.1.4	Rotavírus grupos D (RVD), F (RVF) e G (RVG).....	23
1.2.1.5	Rotavírus grupo E (RVE).....	23
1.3	ROTAVÍRUS GRUPO H (RVH).....	24
1.4	REFERÊNCIAS.....	26
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	39
2.1	OBJETIVO GERAL.....	40
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	40
<b>3</b>	<b>SPECIES H ROTAVIRUS DETECTED IN PIGLETS WITH DIARRHEA, BRAZIL, 2012</b> .....	41
<b>4</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	52
<b>5</b>	<b>PERSPECTIVAS</b> .....	54
5.1	MOLECULAR.....	55
5.2	EPIDEMIOLÓGICA.....	55
	<b>APÊNDICES</b> .....	56
	APÊNDICE A – Fluxograma do desenvolvimento do trabalho.....	57
	APÊNDICE B – Perfil de migração em eletroforese em gel de poliacrilamida 7,5% vizualizado por coloração com nitrato de prata, do dsRNA de RV grupos A, C e B e o identificado nas amostras fecais (BR59, BR60 e BR63) diarreicas de suínos caracterizadas como RVH.....	58

<b>ANEXOS</b> .....	59
ANEXO A – Lista de Reagentes .....	60
ANEXO B – Soluções e Tampões .....	63
ANEXO C – Protocolo de Técnicas.....	69
ANEXO D – Lista de <i>Softwares</i> .....	79

## **1. REVISÃO DE LITERATURA**

---

## 1. REVISÃO DE LITERATURA

---

### 1.1 INTRODUÇÃO

A carne suína é a mais produzida e consumida no mundo (ABIPECS, 2014). No Brasil, com o decorrer dos anos, a cadeia produtiva de suínos apresentou crescimento considerável e, atualmente, é tão moderna quanto a dos países desenvolvidos. O país possui o quarto maior rebanho suíno do mundo, com aproximadamente 41 milhões de cabeças e foi responsável pela produção de mais de 3 milhões de toneladas de carne em 2013. Além disso, o Brasil também ocupa o quarto lugar no ranking mundial de exportação de carne suína, tendo exportado 518 mil toneladas de carne em 2013, gerando receita cambial de US\$1,35 bilhão (ABIPECS, 2014).

A intensificação tecnológica, concentração e especialização na produção de animais, o sistema de abate e processamento da carne são alguns dos fatores que possibilitaram a consolidação nos mercados interno e externo (MIELE; WAQUIL, 2006). Entretanto, o sistema intensivo de produção de suínos gera problemas sanitários que podem comprometer seriamente a produção.

Diversas doenças podem acometer os suínos, porém a diarreia neonatal constitui importante problema sanitário que afeta a produção, independente do nível de tecnificação da criação. Paul e Lyoo (1993), na década de noventa, já afirmavam que os prejuízos econômicos determinados pelos episódios de diarreia podem comprometer a longevidade da exploração suinícola em decorrência dos aumentos nas taxas de mortalidade e morbidade, assim como, pelas despesas com mão de obra e tratamento dos animais infectados.

A diarreia neonatal é caracterizada como uma síndrome multifatorial e multietiológica que envolve falhas nos manejos zootécnico e sanitário (más condições higiênicas, privação do colostro aos leitões e fatores individuais de susceptibilidade), além de uma série de microrganismos como bactérias (*Escherichia coli* enterotoxigênica, *Salmonella* spp., *Clostridium perfringens* tipo C, *Clostridium difficile*), protozoários (*Cryptosporidium* spp, *Isoospora suis*, *Eimeria* sp.) e vírus (rotavírus, coronavírus, calicivírus) (GREGORI *et al.*, 2004; KATSUDA *et al.*, 2006; BARRY; ALFIERI; ALFIERI, 2008; LINARES *et al.*, 2009; ALFIERI; ALFIERI; BARRY, 2010; ALFIERI; LORENZETTI; ALFIERI, 2012).

## 1.2 ROTAVÍRUS

Com relação à etiologia viral das diarreias, o rotavírus (RV) representa um problema de saúde pública mundial, pois é considerado um dos agentes causadores mais comuns de gastroenterite aguda em crianças (CASHMAN *et al.*, 2012; KOO *et al.*, 2013), mamíferos domésticos, silvestres e aves (ALFIERI *et al.*, 2007; ABE *et al.*, 2009).

As primeiras descrições do RV datam da década de 70, onde partículas virais denominadas inicialmente como *reovirus-like/orbivirus-like* foram detectadas, por microscopia eletrônica, infectando as células das porções superiores do epitélio duodenal de crianças com gastroenterite aguda (BISHOP *et al.*, 1973). A partir de análises das partículas virais ao microscópio eletrônico e de sua semelhança morfológica com uma roda (rota, em latim), Flewett *et al.*, (1974) propuseram a nomenclatura Rotavírus para os vírus encontrados. Logo após sua detecção e identificação, os rotavírus humanos foram então associados com descrições prévias de partículas virais idênticas relacionadas com o surgimento de diarreia severa em camundongos (EDIM vírus) (ADAMS; KRAFT, 1963) e bezeros (NCDV) (MEBUS *et al.*, 1969) recém-nascidos e com a cepa viral SA11 detectada em um macaco saudável (MALHERBE; STRICKLAND-CHOMLEY, 1967).

Em suínos, a rotavirose caracteriza-se por comprometer animais jovens, principalmente entre a segunda e a quarta semanas de vida (BOHL *et al.*, 1978; UTRERA *et al.*, 1984; WIELER *et al.*, 2001; ALFIERI *et al.*, 2007). Embora, em muitos casos, os animais acometidos não apresentem sinais clínicos, a infecção por RV é considerada enzoótica nos rebanhos suínos de todo mundo, independentemente do grau de tecnificação e do manejo adotado.

Os RV são, geralmente, espécie-específicos, porém a ocorrência de infecções entre diferentes espécies animais, denominadas infecções heterólogas, tem sido demonstrada (COOK *et al.*, 2004; GHOSH *et al.*, 2012; DEGIUSEPPE *et al.*, 2013; PAPP *et al.*, 2013a).

A transmissão viral ocorre primariamente pela via fecal-oral, através da ingestão de água e/ou alimentos contaminados com fezes de animais infectados. Matrizes prenhes, quando portadoras, eliminam os RV por meio das fezes para o ambiente, principalmente nos dias que antecedem ao parto, sendo fonte de infecção para os leitões. Animais infectados eliminam os RV tanto nas fezes normais quanto diarreicas. Há relatos da possibilidade da transmissão por aerossóis, principalmente quando as condições de umidade e

ventilação do ambiente são favoráveis (COOK *et al.*, 1996; DEWEY *et al.*, 2003; ESTES; KAPIKIAN, 2007).

Os episódios de diarreia ocorrem devido ao tropismo dos RV por enterócitos maduros das porções média e superior das vilosidades intestinais de animais e seres humanos (LUNDGREN; SVENSSON, 2001). Durante a replicação viral ocorre a lise das células infectadas. A redução da capacidade de absorção dos enterócitos, a descamação do epitélio intestinal e a atrofia das vilosidades causam o quadro diarreico (ESTES; KAPIKIAN, 2007).

Os sinais clínicos iniciam por volta do terceiro dia pós-infecção e os animais podem excretar o vírus por até oito dias após a recuperação (DEWEY *et al.*, 2003). Os animais apresentam, principalmente, diarreia de consistência pastosa a líquida e de curta duração, em média por três dias. A desidratação é frequente em leitões muito jovens, onde a infecção é mais grave (THEIL; SAIF, 1985). A morbidade da rotavirose suína é alta, principalmente nas primoinfecções, porém a mortalidade é variável e oscila entre 7-20% (BOHL *et al.*, 1978).

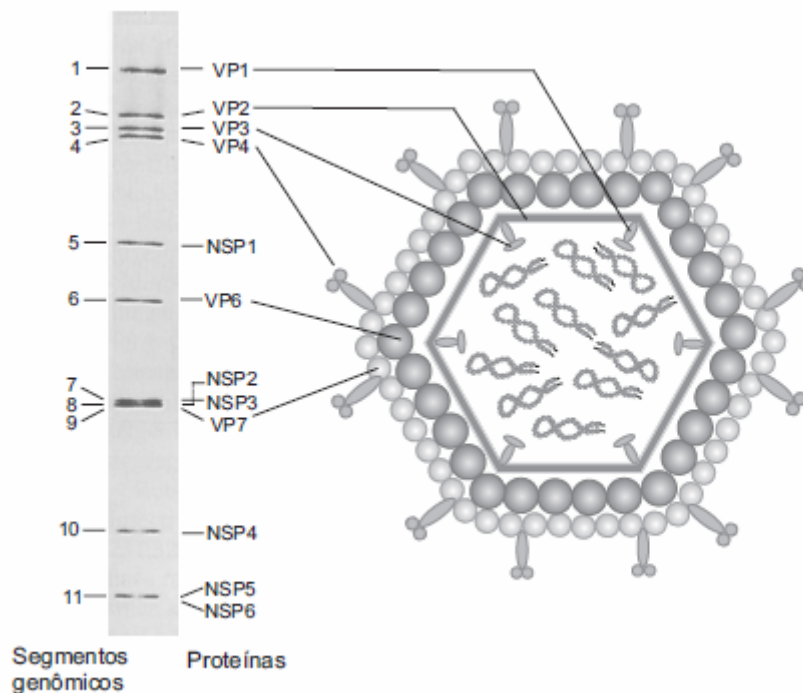
### 1.2.1 Taxonomia

Os RV são membros da família *Reoviridae* e pertencem ao gênero *Rotavirus*. O vírion, desprovido de envelope glicoproteico, apresenta aproximadamente 75-100 nm de diâmetro e um capsídeo composto por três camadas proteicas concêntricas de simetria icosaédrica. O genoma viral é constituído por 11 segmentos de RNA fita dupla (dsRNA) que codificam seis proteínas estruturais (VP - *Viral Protein*) e seis proteínas não-estruturais (NSP - *Non Structural Protein*) (ESTES; KAPIKIAN, 2007). A nomenclatura das VPs (VP1; VP2; VP3; VP4; VP6 e VP7) e das NSPs (NSP1; NSP2; NSP3; NSP4; NSP5; NSP6), presentes em partículas virais maduras, são seguidas por números em ordem decrescente da massa molecular, de acordo com a ordem de migração em eletroforese em gel de poliacrilamida (*polyacrylamide gel electrophoresis* – PAGE) (PEDLEY *et al.*, 1983) (Figura 1).

Na camada interna do capsídeo, também denominada de *core* ou núcleo viral, estão dispostas as proteínas VP1, VP3 e VP2, sendo que as duas primeiras estão intimamente associadas ao genoma viral. A camada intermediária é formada pela proteína VP6 e a externa pelas proteínas VP4 e VP7 (ESTES; KAPIKIAN, 2007). As proteínas NSPs são sintetizadas em células infectadas e apresentam funções em etapas do ciclo replicativo ou

interação com proteínas do hospedeiro que influenciam na patogênese e na resposta imune da infecção (GREENBERG; ESTES, 2009) (Figura 1).

**Figura 1** –Eletroforese em gel de poliacrilamida mostrando os segmentos genômicos (dsRNA) do rotavírus (esquerda); as proteínas codificadas por cada segmento, sendo as proteínas estruturais denominadas VPs e as não-estruturais NSPs (centro), e uma ilustração simplificada da partícula viral e do seus componentes (direita). Os segmentos genômicos estão numerados com base na migração do genoma da cepa Sa11 pertencente aos rotavírus do grupo A.



**Fonte:** ALFIERI *et al.*, 2007 (Adaptado de ESTES, 2001)

A proteína estrutural VP6, que forma a camada intermediária do capsídeo, é a proteína mais abundante do vírion, representando cerca de 50 a 60% da massa viral (ESTES; KAPIKIAN, 2007). Por ser considerada uma das proteínas mais imunogênicas e antigênicas é frequentemente detectada em sistemas de diagnósticos e ensaios imunológicos. De acordo com as características antigênicas e moleculares dessa proteína, os RV podem ser classificados em cinco grupos/espécies (A-E) e em outros dois grupos/espécies propostos (F, G) (ATTOUI *et al.*, 2012). Recentemente, com base na análise molecular também da proteína VP6, Matthijnssens *et al.* (2012) propuseram a criação de um novo grupo de RV, denominado grupo H.

Dos oito grupos de RV, os grupos A, B, C e H determinam infecções que podem ser consideradas de importância epidemiológica para seres humanos e animais

domésticos (ALFIERI *et al.*, 1999; RAHMAN *et al.*, 2007; SANTOS *et al.*, 2008; STEYER *et al.*, 2008; MÉDICI *et al.*, 2010a; MATTHIJNSSENS *et al.* 2012). Os outros grupos D, E, F e G de RV foram descritos infectando apenas animais (PEDLEY *et al.*, 1986; DEVITT; REYNOLDS, 1993; OTTO *et al.*, 2012). Entretanto, a maioria das cepas virais identificadas em seres humanos e animais com diarreia pertencem aos RV grupo A (RVA) (ALFIERI *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2008; LINARES *et al.*, 2009; LORENZETTI *et al.*, 2011; MÉDICI *et al.*, 2011).

#### 1.2.1.1 Rotavírus grupo A (RVA)

Os RVA são considerados uma das causas mais comuns de diarreia aguda em recém-nascidos e crianças em todo o mundo, porém, também podem infectar adultos, mamíferos jovens e aves de várias espécies. A ampla disseminação dos RVA é facilitada por sua excreção, podendo chegar a altos títulos (cerca de  $10^{10}$  a  $10^{11}$  partículas virais por grama de fezes); pela existência de animais assintomáticos; e pela grande resistência do vírus no ambiente (ALFIERI *et al.*, 2007; ESTES; KAPIKIAN, 2007).

Com base na diversidade antigênica das proteínas estruturais VP7 e VP4, localizadas na camada externa do capsídeo, ou dos segmentos genômicos que as codificam, é possível a caracterização das cepas do RVA em sorotipos e/ou genotipos. Com isso, de acordo com as características antigênicas da glicoproteína VP7 (G tipo) ou da proteína VP4 (P tipo), protease sensível, os RVA são classificados por um sistema binário (KAPIKIAN; HOSHINO; CHANOCK, 2001). Atualmente, são reconhecidos 27 G tipos e 37 P tipos de RVA identificados em seres humanos e várias espécies de animais, incluindo mamíferos e aves, demonstrando a ampla diversidade antigênica e molecular desse grupo de RV (MATTHIJNSSENS *et al.*, 2011; TROJNAR *et al.*, 2013).

Dentre os vários genotipos G e P de RVA descritos, os genotipos G mais frequentemente identificados em infecções entéricas em suínos são G3, G4, G5 e G11, associados com P[6] e P[7], que são considerados os genotipos P mais comuns nessa espécie animal. As combinações mais frequentes de G e P tipos em cepas de RVA suíno 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; LORENZETTI *et al.*, 2011; PAPP *et al.*, 2013b).

Devido à grande diversidade genética encontrada nas cepas de RVA e à possibilidade de ocorrência de *reassortment* em todos os segmentos do genoma, um novo sistema de classificação com base nos onze genes foi proposto e os genótipos adotados para as proteínas VP7-VP4-VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5/6 foram Gx-P[x]-Ix-Rx-Cx-Mx-Ax-Nx-Tx-Ex-Hx, respectivamente (Quadro 1). Para cada gene foram estabelecidos os valores de ponto de corte apropriados (MATTHIJNSSENS *et al.*, 2008a).

**Quadro1** – Porcentagem de identidade de nucleotídeo para cada gene (ponto de corte) que define os genótipos para os 11 segmentos genômicos dos rotavírus do grupo A.

Produto gênico	Ponto de corte (%)	Genótipo ( <i>n</i> ) <sup>b</sup>	Descrição do produto gênico
VP7	80 (89) <sup>a</sup>	G (27)	<i>Glycolylated</i>
VP4	80 (89) <sup>a</sup>	P (37)	<i>Protease sensitive</i>
VP6	85	I (18)	<i>Intermediate capsid Shell</i>
VP1	83	R (9)	<i>RNA-dependent RNA Polymerase</i>
VP2	84	C (9)	<i>Core shell protein</i>
VP3	81	M (8)	<i>Methyltransferase</i>
NSP1	79	A (18)	<i>Interferon Antagonist</i>
NSP2	85	N (10)	<i>NTPase</i>
NSP3	85	T (12)	<i>Translation enhancer</i>
NSP4	85	E (15)	<i>Enterotoxin</i>
NSP5	91	H (11)	<i>pHosphoprotein</i>

<sup>a</sup> Ponto de corte com base na porcentagem de aminoácido.

<sup>b</sup> Número de genótipos

**Fonte:** adaptado de MATTHIJNSSENS *et al.*, 2008a, 2008b, 2011; GUO *et al.*, 2012; PAPP *et al.*, 2012; TROJNAR *et al.*, 2013; JERE *et al.*, 2014. Em negrito destacada a letra que gerou a denominação do genótipo.

A ocorrência de infecções heterólogas sugere que os suínos podem atuar como reservatórios de cepas de RVA para os humanos e até mesmo para outras espécies animais, se estes forem infectados com uma cepa que seja bem adaptada nas duas espécies. Genótipos como G1, G2, G9, G12 e P[6] (cepas M37-like) 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, 2006; GHOSH *et al.*, 2006).

#### 1.2.1.2 Rotavírus grupo B (RVB)

Os RVB foram associados, primariamente, com episódios de diarreia aguda em seres humanos adultos em países como China (HUNG *et al.*, 1984; CHEN *et al.*, 1985), Índia (KRISHNAN *et al.*, 1999; KELKAR; ZADE, 2004), Bangladesh (SANEKATA *et al.*, 2003) e Myanmar (AUNG *et al.*, 2009). Além de humanos, os RVB também já foram identificados em roedores (EIDEN *et al.*, 1992), bovinos (CHANG *et al.*, 1997; TSUNEMITSU *et al.*, 1999), suínos (KUGA *et al.*, 2009) e ovinos (SHEN *et al.*, 1999). Em suínos, os RVB estão relacionados com doenças gastrointestinais em animais nas fases de pré e pós-desmame (JANKE *et al.*, 1990).

Brown *et al.* (1987) já demonstraram alta prevalência de anticorpos anti-RVB no soro de suínos adultos. Porém, tanto a caracterização antigênica e molecular quanto a prevalência da infecção por esse grupo de RV ainda não estão claramente estabelecidos, principalmente devido à dificuldade de adaptação viral em cultivos celulares, uma vez que são excretados em pequenas quantidades nas fezes de animais infectados (THEIL; SAIF, 1985).

Estudos moleculares direcionados aos genes que codificam para as proteínas da camada interna do capsídeo viral indicam particularidades nos RVB quando comparados aos RVA e RVC (CHEN *et al.*, 1991). A variação genética existente entre as cepas de RVB ainda é pouco caracterizada, porém análises de nucleotídeos e de aminoácidos têm demonstrado grande diversidade entre cepas de RVB em relação aos RVA e RVC (CHANG *et al.*, 1997; CHEN *et al.*, 2002). Análises moleculares demonstraram também grande variabilidade nas proteínas VP6, VP7, NSP2 de cepas de RVB provenientes de diferentes hospedeiros e regiões geográficas (CHEN *et al.*, 1991; PEDRIC *et al.*, 1991; EIDEN; ALLEN, 1992; CHANG *et al.*, 1997; KANG *et al.*, 2005; KUGA *et al.*, 2009; SUZUKI *et al.*, 2012a; MATTHIJNSSENS *et al.*, 2012; MARTHALER *et al.*, 2012).

Ao contrário dos RVA, para os quais há informações sobre a caracterização molecular do genoma completo de várias cepas virais, o conhecimento relacionado ao genoma de RVB de origem suína permanece restrito às análises das proteínas VP6, VP7, NSP1, NSP2 e NSP5 (KUGA *et al.*, 2009; MÉDICI *et al.*, 2010a; SUZUKI *et al.*, 2011; SUZUKI *et al.*, 2012a,b; MATTHIJNSSENS *et al.*, 2012; MARTHALER *et al.*, 2012).

### 1.2.1.3 Rotavírus grupo C (RVC)

Os RVC foram primeiramente descritos em episódios de diarreia em suínos (SAIF *et al.*, 1980; BOHL *et al.*, 1982). Desde então, tem sido descrito em humanos, bovinos, caninos e furões (RODGER; BISHOP; HOLMES, 1982; TORRES-MEDINA, 1987; TSUNEMITSU *et al.*, 1991; OTTO *et al.*, 1999). Em humanos, infecções por RVC têm sido associadas com episódios esporádicos e também em surtos de gastroenterite, predominantemente em crianças (PEREIRA *et al.*, 1983; BRIDGER; PEDLEY; McCRAE, 1986; ARISTA *et al.*, 1990; JIANG *et al.*, 1995; KUZUYA *et al.*, 1998; SCHNAGL *et al.*, 2004; RAHMAN *et al.*, 2005; BANYAI *et al.*, 2006).

Estudos de soroprevalência demonstraram altas taxas de anticorpos contra RVC em suínos de todas as idades. No entanto, os títulos mais elevados foram encontrados em animais adultos (TERRETT *et al.*, 1987; SAIF; JIANG, 1994). Análises sorológicas e moleculares indicam que o RVC está disseminado por todo o mundo, sendo considerado um patógeno emergente (BANYAI *et al.*, 2006; IIZUKA *et al.*, 2006; GABBAY *et al.*, 2008; MÉDICI *et al.*, 2010b).

Sequências genômicas de RVC já foram determinadas para cepas virais provenientes de infecções em humanos, bovinos e suínos; entretanto as informações genéticas relacionadas a este grupo viral ainda é limitada. A maioria dos genes estudados são os que codificam as proteínas VP7, VP4 e VP6 (MAWATARI *et al.*, 2004; KUZUYA *et al.*, 2007; MÉDICI *et al.*, 2010b). Sequências genômicas completas foram estabelecidas para nove cepas de RVC, sendo oito de origem humana e apenas uma de origem suína (ALFIERI *et al.*, 1999; CHEN *et al.*, 2002; YAMAMOTO *et al.*, 2011; BEAK *et al.*, 2013).

Assim como no RVA, a diversidade molecular das proteínas estruturais VP4 e VP7 possibilita a classificação das cepas de RVC em P e G tipos. Com base nesse sistema de classificação, diferentes genótipos de RVC suíno já foram descritos (P[1]; GI – G9) (JIANG *et al.*, 1999; MARTELLA *et al.*, 2007, COLLINS *et al.*, 2008; MARTHALER *et al.*, 2013). Além disso, a ocorrência de transmissão heteróloga já foi identificada. Cepas de RVC suíno foram detectadas em crianças que apresentavam ou não quadro clínico de diarreia, sugerindo a possibilidade de essa espécie animal atuar como reservatório para cepas virais com potencial zoonótico (GABBAY *et al.*, 2008).

#### 1.2.1.4 Rotavírus grupos D (RVD), F (RVF) e G (RVG)

Juntamente com os RVA, os RVD, RVF e RVG fazem parte dos RV associados com quadros de enterite em aves (OTTO *et al.*, 2006; TROJNAR *et al.*, 2010; JOHNE *et al.*, 2011). Embora, inicialmente, tenham sido identificados em fezes de frangos de corte (McNULTY *et al.*, 1984; PEDLEY *et al.*, 1986), sua ocorrência em patos, perus, faisões, pombos e pássaros silvestres também já foi descrita em várias regiões geográficas (McNULTY *et al.*, 1979; THEIL; REYNOLDS; SAIF., 1986; REYNOLDS; THEIL; SAIF, 1987; TAKASE *et al.*, 1990; TAKEHARA *et al.*, 1991; GOUGH; COX; DEVOY, 1992; MINAMOTO *et al.*, 1988; PANTIN-JACKWOOD *et al.*, 2007).

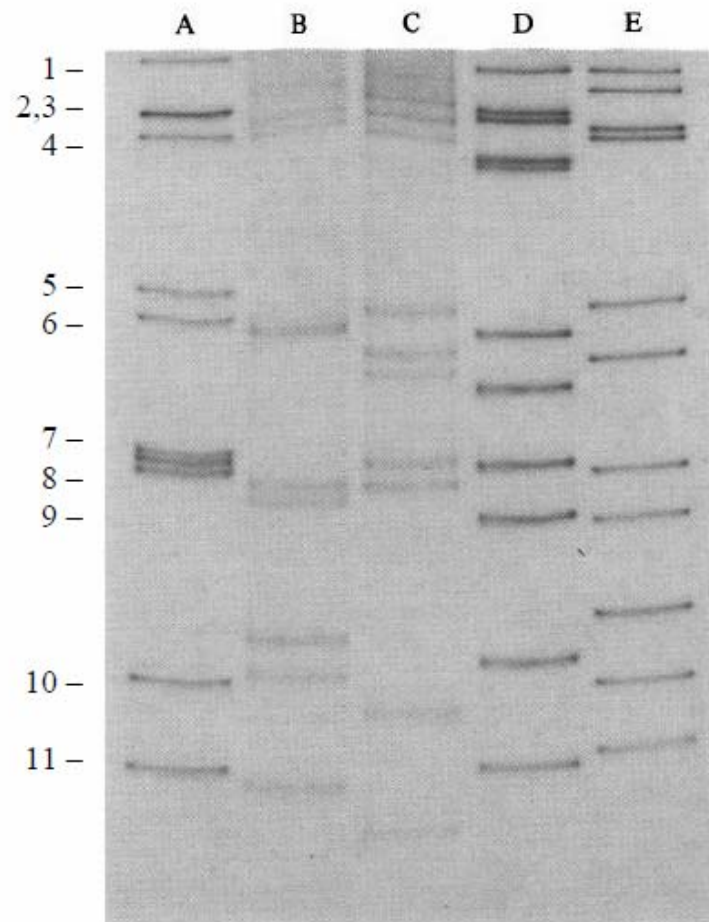
Embora identificados em diferentes espécies de aves, a caracterização molecular de RVD, RVF e RVG ainda não está bem estabelecida. A maioria dos estudos é baseada na análise do segmento genômico que codifica a proteína VP6. Com relação à análise da sequência de nucleotídeos do genoma completo existe a descrição de apenas uma cepa pertencente a cada grupo (JOHNE *et al.*, 2011; MATTHIJNSSENS *et al.*, 2012; TROJNAR *et al.*, 2010; KINDLER *et al.*, 2013).

Na comparação das sequências genômicas de RVD, RVF e RVG com aquelas de outros grupos de RV são observadas baixas identidades. Entretanto, RVG e RVB apresentam maior semelhança molecular, o que indica diversificação relativamente tardia durante a evolução desses grupos virais (MATTHIJNSSENS *et al.*, 2012; KINDLER *et al.*, 2013).

#### 1.2.1.5 Rotavírus grupo E (RVE)

As únicas descrições de RVE datam da década de 1980 (CHASEY *et al.*, 1985; PEDLEY *et al.*, 1986). Cepas de RVE foram descritas no Reino Unido a partir de fezes de leitões com diarreia. A confirmação da presença do novo grupo de RV na etiologia de infecções entéricas se deu por meio de imunofluorescência indireta, o que comprovou que as cepas de RVE apresentavam antígenos próprios. Adicionalmente, a análise do perfil eletroforético em gel de poliacrilamida demonstrou que a migração dos segmentos genômicos de RVE era distinta quando comparada com o eletroferotipo de RVA, RVB, RVC e RVD (Figura 2) (PEDLEY *et al.*, 1986).

**Figura 2** –Eletroforese em gel de poliacrilamida mostrando a diferença de migração dos segmentos genômicos dos rotavírus do grupo E em relação aos outros grupos de rotavírus.



**Fonte:** PEDLEY *et al.*, 1986

Chasey *et al.* (1985) descreveram ampla distribuição de anticorpos RVE específicos em suínos do Reino Unido. Além disso, a inoculação de RVE em leitões gnotobióticos foi responsável pelo desenvolvimento de sinais clínicos moderados de enterite. Entretanto, não existem estudos que forneçam informações sobre a caracterização molecular dos genes de RVE.

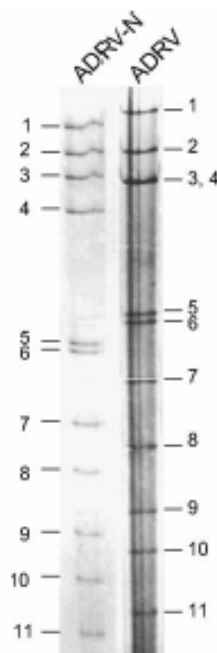
### 1.3 ROTAVÍRUS GRUPO H (RVH)

Recentemente, com base na análise molecular da proteína VP6, Matthijssens *et al.* (2012) propuseram a criação de um novo grupo de RV. Os RV grupo H (RVH) foram descritos pela primeira vez em um surto de diarreia em adultos na China em 1997 (YANG *et al.*, 1998; CHEN *et al.*, 1998). Os sinais clínicos causados pela infecção viral eram semelhantes àqueles observados em outro surto de diarreia também descrito na China

em 1983, ocasionado pela cepa ADRV – *Adult diarrhoea Rotavirus*, classificada como RVB (HUNG *et al.*, 1983; CHEN *et al.*, 1985). A análise ao microscópio eletrônico indicou que o agente etiológico responsável pelo surto ocorrido em 1997 apresentava morfologia compatível com o gênero *Rotavirus*. No entanto, o perfil de migração dos segmentos genômicos após eletroforese em gel de poliacrilamida era diferente dos outros perfis já conhecidos (Figura 3). Análises posteriores demonstraram que antissoros induzidos por inoculações experimentais com RVA, RVB e RVC não reagiram com a nova cepa de RV. Adicionalmente, *primers* específicos selecionados para a amplificação por RT-PCR dos genes VP6 e VP7 da cepa ADRV de RVB não permitiram a amplificação de fragmentos genômicos dessa nova cepa de RV. Entretanto, o isolamento do novo RV em cultivos de células renais de embriões humanos e células MA-104 foi bem sucedido (YANG *et al.*, 1998; CHEN *et al.*, 1998; JI *et al.*, 2002; YANG *et al.*, 2004).

Com base no perfil eletroforético do genoma viral, nas análises sorológicas e na similaridade dos sinais clínicos causados pela infecção viral com aqueles descritos no surto ocorrido na China em 1983, ocasionado pela cepa ADRV, o novo RV recebeu a nomenclatura de *Novel adult diarrhoea Rotavirus* – NADRV (YANG *et al.*, 1998; JI *et al.*, 2002).

**Figura 3** – Análise comparativa do perfil eletroforético do novo rotavírus (NADRV) com a cepa ADRV (*Adult diarrhoea Rotavirus*) pertence aos rotavírus do grupo B.



**Fonte:** YANG *et al.*, 2004

Além da cepa NADRV, também foram incluídos no grupo H a cepa J19, pertencente ao surto de diarreia ocorrido na China em 1997 (JI *et al.*, 2002; JIANG *et al.*, 2008), o RV humano B219, detectado em amostra de fezes de um paciente de 65 anos de idade que apresentou quadro esporádico de diarreia em Bangladesh em 2002 (ALAM *et al.*, 2007; NAGASHIMA *et al.*, 2008), e a cepa de RV suíno SKA-1, isolada de um leitão com diarreia no Japão (SANEKATA *et al.*, 1996; WAKUDA *et al.*, 2011).

A epidemiologia e a caracterização antigênica e molecular do RVH, tanto de origem humana quanto suína, permanecem pouco elucidadas. A análise do genoma viral é de importância relevante para a compreensão da biologia e evolução dos vírus. O genoma completo das cepas humanas J19 e B219 já foi descrito (ALAM *et al.*, 2007; JIANG *et al.*, 2008; NAGASHIMA *et al.*, 2008). Porém, o conhecimento relacionado ao genoma de RVH de origem suína permanece restrito às análises das proteínas VP4, VP6, VP7 e NSP4 da cepa SKA-1 isolada no Japão (WAKUDA *et al.*, 2011). Análises filogenéticas comparativas mostraram que as cepas de RVH não se agrupam com nenhuma das espécies de RV já estabelecidas (RVA-RVG), no entanto, parecem estar relacionadas com o RVB (YANG *et al.*, 2004; ALAM *et al.*, 2007; NAGASHIMA *et al.*, 2008; JIANG *et al.*, 2008; WAKUDA *et al.*, 2011; MATTHIJNSSENS *et al.*, 2012).

Informações adicionais com relação aos demais segmentos genômicos do RVH suíno, bem como sobre os genes já estudados, particularmente por meio da análise de maior número de cepas virais são necessárias para compreender a origem e o parentesco genético dos RVH tanto de origem suína quanto de origem humana, bem como sua provável relação com RVB. Além disso, os conhecimentos gerados e acumulados em estudos com essa vertente ampliarão as informações disponíveis sobre as características antigênicas e moleculares desse grupo viral, possibilitando o desenvolvimento de investigações complementares com foco nos processos de mutação, rearranjo e recombinação dos genes de RVH.

#### 1.4 REFERÊNCIAS

ABE, A.; ITO, N.; MORIKAWA, S.; TAKASU, M.; MURASE, T.; KAWASHIMA, T.; KAWAI, Y.; KOHARA, J.; SUGIYAMA, M. Molecular epidemiology of rotaviruses among healthy calves in Japan: Isolation of a novel bovine rotavirus bearing new P and G genotypes. **Virus Research**, v.144, n.1-2, p.250-257, 2009.

ADAMS, W.R.; KRAFT, L.M. Epizootic diarrhea of infant mice: identification of the etiologic agent. **Science**, v.141, p.359-60, 1963.

ALAM, M.M.; KOBAYASHI, N.; ISHINO, M.; AHMED, M.S.; AHMED, M.U.; PAUL, S.K.; Muzumdar, B.K.; Hussain, Z.; Wang, Y.H.; Naik, T.N. Genetic analysis of an ADRV-N-like novel rotavirus strain B219 detected in a sporadic case of adult diarrhea in Bangladesh. **Archives of Virology**, v.152, p.199–208, 2007.

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, 1999.

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.

ALFIERI, A.A.; ALFIERI, A.F.; TAKIUSHI, E.; LOBATO, Z.I.P. Reoviridae. In: **Virologia Veterinária**. FLORES, E.F. (Org.). Santa Maria: Editora da UFSM, Brasil. p.773-807, 2007.

ALFIERI, A.A.; ALFIERI, A.F.; BARRY, A.F. Diarreias em suínos. In: **Tópicos em Sanidade e Manejo de Suínos**, Campinas: Sanphar, p.165-206, 2010.

ALFIERI, A.A.; LORENZETTI, E.; ALFIERI, A.F. Rotavírose neonatal e do pós-desmame em suínos. **Porkworld**, v.67, p.57-63, 2012.

ARISTA, S.; GIOVANNELLI, L.; PISTOIA, D.; CASCIO, A.; PAREA, M.; GERNA, G. Electropherotypes, subgroups and serotypes of human rotavirus strains causing gastroenteritis in infants and young children in Palermo, Italy, from 1985 to 1989. **Research Virology**, v.141, p.435-448, 1990.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA PRODUTORA E EXPORTADORA DE CARNE SUÍNA – **ABIPECS**. Disponível em <http://www.abipecs.org.br/pt/estatisticas.html>. Acessado em 12.02.14.

ATTOUI, H.; MERTENS, P.P.C.; BECNEL, J.; BELAGANAHALLI, S.; BERGOIN, M.; BRUSSAARD, C.P.; CHAPPELL, J.D.; CIARLET, M.; DEL VAS, M.; DERMODY, T.S.; DORMITZER, P.R.; DUNCAN, R.; FANG, Q.; GRAHAM, R.; GUGLIELMI, K.M.; HARDING, R.M.; HILLMAN, B.; MAKKAY, A.; MARZACHI, C.; MATTHIJNSSENS, J.; MILNE, R.G.; JAAFAR, F.M.; MORI, H.; NOORDELOOS, A.A.; OMURA, T.; PATTON, J.T.; RAO, S.; MAAN, M.; STOLTZ, D.; SUZUKI, N.; UPADHYAYA, N.M.; WEI, C.; ZHOU, H. Family: Reoviridae. In: KING, A.M.Q.; ADAMS, M.J.; CARSTENS, E.B.; LEFKOWITZ, E.J. (Eds.), **Virus Taxonomy: Ninth Report of the ICTV**. Elsevier Academic Press, Amsterdam, p.541–637, 2012.

AUNG, T.S.; KOBAYASHI, N.; NAGASHIMA, S.; GHOSH, S.; AUNG, M.S.; OO, K.Y.; WIN, N. Detection of group B rotavirus in an adult with acute gastroenteritis in Yangon, Myanmar. **Journal of Medical Virology**, v.81, p.1968–1974, 2009.

BANYAI, K.; JIANG, B.; BOGDAN, A.; HORVATH, B.; JAKAB, F.; MELEG, E.; MARTELLA, V.; MAGYARI, L.; MELEGH, B.; SZUCS, G. Prevalence and molecular characterization of human group C rotaviruses in Hungary. **Journal of Clinical Virology**, v.37, p.317-322, 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.

BARRY, A.F.; ALFIERI, A.F.; ALFIERI, A.A. Detection and phylogenetic analysis of porcine enteric calicivirus, genetically related to the Cowden strain of sapovirus genogroup III, in Brazilian swine herds. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.28, n.1, p.82-86, 2008.

BEAK, I.H.; THAN, V.T.; KIM, H.; LIM, I.; KIM, W. Full genomic characterization of a group C rotavirus isolated from a child in South Korea. **Journal of Medical Virology**, v.85, p.1478-1484, 2013.

BISHOP, R.F.; DAVIDSON, G.P.; HOLMES, I.H.; RUCK, B.J. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. **Lancet**, v.2, p.1281-1283, 1973.

BOHL, E.H.; HOHLER, E.M.; SAIF, L.J.; CROSS, R.F.; AGNES, A.G.; THEIL, K.W. Rotavirus as a cause of diarrhea in pigs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.172, p. 458-463, 1978.

BOHL, E.H., SAIF, L.J., THEIL, K.W.A., AGNES, G., CROSS, R.F. Porcine pararotavirus: detection, differentiation from rotavirus, and pathogenesis in gnotobiotic pigs. **Journal of Clinical Microbiology**, v.15, p.312-319, 1982.

BRIDGER, J.C.; PEDLEY, S.; McCRAE, M.A. Group C rotaviruses in humans. **Journal of Clinical Microbiology**, v.23, p.760-763, 1986.

BROWN, D.W.; BEARDS, G.M.; CHEN, G.M.; FLEWETT, T.H. Prevalence of antibody to group B (atypical) rotavirus in humans and animals. **Journal of Clinical Microbiology**, v.25, p.316-319, 1987.

CASHMAN, O.; COLLINS, P. J.; LENNON, G.; CRYAN, B.; MAETELLA, V.; FANNING, S; STAINES, A.; O'SHEA, H. Molecular characterization of group A rotaviruses detected in children with gastroenteritis in Ireland in 2006-2009. **Epidemiology and Infection**, v. 140 p.247-259, 2012.

CHANG, K.O.; PARWANI, A.V.; SMITH, D.; SAIF, L.J. Detection of Group B rotaviruses in fecal samples from diarrheic calves and adult cows and characterization of their VP7 genes. **Journal of Clinical Microbiology**, v.35, n.8, p.2107-2110, 1997.

CHASEY, D.; BRIDGER, J.C.; McCRAE, M.A. A new type of atypical rotavirus in pigs. **Archives of Virology**, v.89, p. 235-243, 1986.

CHEN, G.M.; HUNG, T.; BRIDGER, J.C.; McCRAE, M.A. Chinese adult rotavirus is a group B rotavirus. **Lancet**, v.326, p.1123-1124, 1985.

CHEN, G.M.; WERNER-ECKERT, R.; TAO, H.; MACKWO, E.R. Expression of the major inner capsid protein of group B rotavirus ADVR: primary characterization of genome segment 5. **Virology**, v.128, p.820-829, 1991.

CHEN, S.; MENG, Z.; ZHANG, Z.; YU, Q.; NIU, J.; ZHANG, Z.; LIU, Y.; ZHANG, S.; LU, X.; YANG, H.; ZHOU, M. Primary report of a novel group B rotavirus that caused an

outbreak of adult diarrhea. **Zhong Guo Gong Gong Wei Sheng (Chinese Public Health)** v.14, p.139–141, 1998 (in Chinese; English Abstract).

CHEN, Z.; LAMBDEN, P.R.; LAU, J.; CAUL, E.O.; CLARKE, I.N. Human group C rotavirus: completion of the genome sequence and gene coding assignments of a non-cultivable rotavirus. **Virus Research**, v.83, p.179-187, 2002.

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.

COLLINS, P.J.; MARTELLA, V.; O'SHEA, H. Detection and characterization of group C rotaviruses in asymptomatic piglets in Ireland. **Journal of Clinical Microbiology**, v.46, p.2973-2979, 2008.

COOK, S.M.; GLASS, R.I.; LeBARON, C.W.; MEI-SHANG, H. Global seasonality of rotavirus infectious. **Bulletin of the World Health Organization**, v.68, p.171-177, 1996.

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

DEGIUSEPPE, J.I.; BELTRAMINO, J.C.; MILLÁN, A.; STUPKA, J.A.; PARRA, G.I. Complete genome analyses of G4P[6] rotavirus detected in Argentinean children with diarrhoea provides evidence of interspecies transmission from swine. **Clinical Microbiology and Infection**, v.19, p.367-371, 2013.

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

DEWEY, C.; CARMAN, S.; PASMA, T.; JOSEPHSON, G.; McEWEN. Relationship between group A porcine rotavirus and management practices in swine herds in Ontario. **Canadian Veterinary Journal**, v.44, p.649-653, 2003.

EIDEN, J.J.; ALLEN, J.R. Identification of cognate genes among heterologous strains of group B rotavirus. **Journal of Virology**, v.66, p.1232-1235, 1992.

EIDEN, J.J.; NATARO, J.; VONDERFECHT, S.; PETRIC, M. Molecular cloning, sequence analysis, in vitro expression, and immunoprecipitation of the major inner capsid protein of the IDIR strain of group B rotavirus (GBR). **Virology**, v.188, p.580-589, 1992.

ESTES, M.K.; KAPIKIAN, A.Z. Rotaviruses. In: **Fields Virology**, 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, p.1918–1974, 2007.

FLEWETT, T.H.; BRYDEN, A.S.; DAVIES, H.; WOODE, G.N.; BRIDGER, J.C.; DERRICK, J.M. Relation between viruses from acute gastroenteritis of children and newborn calves. **Lancet**, v.2, p.61–63, 1974.

GABBAY, Y.B.; BORGES, A.A.; OLIVEIRA, D.S.; LINHARES, A.C.; BARARDI, R.M.; WANG, Y.; MASCARENHAS, J.D.P.; GLASS, R.I.; JIANG, B. Evidence for zoonotic

transmission of group C rotaviruses among children in Belém, Brazil. **Journal of Medical Virology**, v.80, p.1666-1674, 2008.

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.

GHOSH, S.; SHINTANI, T.; KOBAYASHI, N. Evidence for the porcine origin of equine rotavirus strains H-1. **Veterinary Microbiology**, v.158, p.410-414, 2012.

GOUGH, R.E.; COX, W.J.; DEVOY, J. Isolation and identification of rotavirus from racing pigeons. **Veterinary Record**, v.130, p.273, 1992.

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.

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

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

GUO, D.; LIU, J.; LU, Y.; SUN, Y.; YUAN, D.; JIANG, Q.; LIN, H.; LI, C.; SI, C.; QU, L. Full genomic analysis of rabbit rotavirus G3P[14] strain N5 in China: Identification of a novel VP6 genotype. **Infection, Genetics and Evolution**, v.12, p.1567-1576, 2012.

HUNG, T.; CHEN, G.M.; WANG, C.G.; CHOU, Z.Y.; CHAO, T.X.; YE, W.W.; YAO, H.L.; MENG, K.H. Rotavirus-like agent in adult non-bacterial diarrhoea in China. **Lancet**, p.1078–1079, 1983.

HUNG, T.; WANG, C.G.; FANG, Z.Y.; CHOU, Z.Y.; CHANG, X.J.; LIONG, X.Q.; CHEN, G.M.; YAO, H.L.; CHAO, T.X.; YE, W.W.; DEN, S.S.; CHANG, W.C. Waterborne outbreak of rotavirus diarrhoea in adults in China caused by a novel rotavirus. **Lancet**, v.323, p.1139-1142, 1984.

IIZUKA, S.; TABARA, K.; KAWAMUKAI, A.; ITOGAWA, H.; HOSHINA, K. An outbreak of group C rotavirus infection in an elementary school in Shimane prefecture, Japan, February 2006. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v.59, p.350-351, 2006.

JANKE, B.H., NELSON, J.K., BENFIELD, D.A., NELSON, E.A. Relative prevalence of typical and atypical strains among rotaviruses from diarrheic pigs in conventional swine herds. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.2, p.308-311, 1990.

JERE, K.C.; ESONA, M.D.; ALI, Y.H.; PEENZE, I.; ROY, S.; BOWEN, M.D.; SAEED, I.K.; KHALAFALLA, A.I.; NYAGA, M.M.; MPHABLELE, J.; STEELE, D.; SEHERI, M.L. Novel NSP1 genotype characterised in an African camel G8P[11] rotavirus strain. **Infection, Genetics and Evolution**, v.21, p.58-66, 2014.

- JI, S.; BI, Y.; YANG, H.; YANG, F.; SONG, J.; TAO, X.; CUI, X. Cultivation and serial propagation of a new rotavirus causing adult diarrhoea in primary human embryo kidney cells. **Zhonghua Yi Xue Za Zhi (National Medicine Journal of China)**, v.82, p.14–18, 2002 (in Chinese; English Abstract).
- JIANG, B.M.; DENNEHY, P.H.; SPANGENBERGER, S.; GENTSCH, J.R.; GLASS, R.I. First detection of Group C rotavirus in fecal specimens of children with diarrhea in the United States. **Journal of Infectious Diseases**, v.172, p.45-50, 1995.
- JIANG, B.; GENTSCH, J.R.; TSUNEMITSU, H.; SAIF, L.J.; GLASS, R.I. Sequence analysis of the gene encoding VP4 of a bovine group C rotavirus: molecular evidence for a new P genotype. **Virus Genes**, v.19, p.85-88, 1999.
- JIANG, S.; JI, S.; TANG, O.; CUI, X.; YANG, H.; KAN, B.; GAO, S. Molecular characterization of a novel adult diarrhea rotavirus strain J19 isolated in China and its significance for the evolution and origin of group B rotaviruses. **Journal of General Virology**, v.89, p.2622–2629, 2008.
- JOHNE, R.; OTTO, P.; ROTH, B.; LÖHREN, U.; BELNAP, D.; REETZ, J.; TROJNAR, E. Sequence analysis of the VP6-encoding genome segment of avian group F and G rotaviruses. **Virology**, v.442, p.384-439, 2011.
- KANG, G.; KELKAR, S.D.; CHITAMBAR, S.D.; RAY, P.; NAIK, T. Epidemiological profile of rotaviral infection in India: challenges for the 21st century. **Journal of Infectious Diseases**, v.192, p.120-126, 2005.
- KAPIKIAN, A.Z.; HOSHINO, Y.; CHANOCK, R.M. Rotaviruses. In: **Fields Virology**. KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (Ed.). 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.
- KELKAR, S.D; ZADE, J.K. Group B rotaviruses similar to strain CAL-1 have been circulating in Western India since 1993. **Epidemiology and Infection**, v.132, p.745-749, 2004.
- KINDLER, E.; TROJNAR, E.; HECKEL, G.; OTTO, P.H.; JOHNE, R. Analysis of rotavirus species diversity and evolution including the newly determined full-length genome sequences of rotavirus F and G. **Infection, Genetics and Evolution**, v.14, p. 58-67, 2013.
- KOO, H.L.; NEILL, F.H.; ESTES, M.K.; MUNOZ, F.M.; CAMERON, A.; DUPONT, H.L.; ATMAR, R.L. Noroviruses: The most common pediatric viral enteric pathogen at a large university hospital after introduction of rotavirus vaccination. **Journal of the Pediatric Diseases Society**, v.2, n.1, p.57-60, 2013.
- KRISHNAN, T.; SEN, A.; CHOUDHURY, J.S.; DAS, S.; NAIK, T.N.; BHATTACHARYA, S.K. Emergence of adult diarrhoea rotavirus in Calcutta, India. **Lancet**, v.353, p.380-381, 1999.

- KUGA, K.; MIYAZAKI, A.; SUZUKI, T.; TAKAGI, M.; HATTORI, N.; KATSUDA, K.; MASE, M.; SUGIYAMA, M.; TSUNEMITSU, H. Genetic diversity and classification of the outer capsid glycoprotein VP7 of porcine group B rotaviruses. **Archives of Virology**, v.154, p.1785-1795, 2009.
- KUZUYA, M.; FUJII, R.; HAMANO, M.; YAMADA, M.; SHINOZAKI, K.; SASAGAWA, A.; HASEGAWA, S.; KAWAMOTO, H.; MATSUMOTO, K.; KAWAMOTO, A.; ITAGAKI, A.; FUNATSUMARU, S.; URASAWA, S. Survey of human group C rotaviruses in Japan during the winter of 1992 to 1993. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, p.6–10, 1998.
- KUZUYA, M.; FUJII, R.; HAMANO, M.; NISHIJIMA, M.; OGURA, H. Detection and molecular characterization of human group C rotaviruses in Okayama Prefecture, Japan, between 1986 and 2005. **Journal of Medical Virology**, v.79, p.1219-1228, 2007.
- 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.
- LORENZETTI, E.; MEDEIROS, T.N.S.; ALFIERI, A.F.; ALFIERI, A.A. Genetic heterogeneity of wild-type G4P[6] porcine rotavirus strains detected in a diarrhea outbreak in a regularly vaccinated pig herd. **Veterinary Microbiology**, v.154, p.191-196, 2011.
- LUNDGREN, O.; SVENSSON, L. Pathogenesis of rotavirus diarrhea. **Microbes and Infection**, v.3, p.1145-1156, 2001.
- MALHERBE, H.H.; STRICKLAND-CHOMLEY, M. Simian virus SA11 and the related 'O' agent. **Arch Gesamte Virusforsch**, v.22, p.235–45, 1967.
- 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.; BÁNYAI, 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.; BÁNYAI, K.; CIARLET, M.; ITURRIZA-GÓMARA, 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.; BANYAI, K.; LORUSSO, E.; DECARO, N.; BELLACICCO, A.; DESARIO, C.; CORRENTE, M.; GRECO, G.; MOSCHIDOU, P.; TEMPESTA, M.; ARISTA, S.; CIARLET, M.; LAVAZZA, A.; BUONAVOGLIA, C. Genetic heterogeneity in the VP7 of group C rotaviruses. **Virology**, v.367, p.358-366, 2007.

MARTHALER, D.; ROSSOW, K.; GRAMER, M.; COLLINS, J.; GOYAL, S.; TSUNEMITSU, H.; KUGA, K.; SUZUKI, T.; CIARLET, M.; MATTHIJNSSENS, J. Detection of substantial porcine group B rotavirus genetic diversity in the United States, resulting in a modified classification proposal for G genotypes. **Virology**, v.433, p.85-96, 2012.

MARTHALER, D.; ROSSOW, K.; CULHANE, M.; COLLINS, J.; GOYAL, S.; CIARLET, M.; MATTHIJNSSENS, J. Identification, phylogenetic analysis and classification of porcine group C rotavirus VP7 sequences from the United States and Canada. **Virology**, v.446, p.189-198, 2013.

MATTHIJNSSENS, J.; CIARLET, M.; HEIMAN, E.; ARIJS, I.; DELBEKE, T.; MCDONALD, S.M.; PALOMBO, E.A.; ITURRIZA-GÓMARA, 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, 2008a.

MATTHIJNSSENS, J.; CIARLET, M.; RAHMAN, M.; ATTOUI, H.; BÁNYAI, K.; ESTES, M.K.; GENTSCH, J.R.; ITURRIZA-GÓMARA, M.; KIRKWOOD, C.D.; MARTELLA, V.; MERTENS, P.P.C.; NAKAGOMI, O.; PATTON, J.T.; RUGGERI, F.M.; SAIF, L.J.; SANTOS, N.; STEYER, A.; TANIGUCHI, K.; DESSELBERGER, U.; VAN RANST, M. Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. **Archives of Virology**, v.153, p.1621-1629, 2008b.

MATTHIJNSSENS, J.; CIARLET, M.; MCDONALD, S.M.; ATTOUI, H.; BÁNYAI, K.; BRISTER, J.R.; BUESA, J.; ESONA, M.D.; ESTES, M.K.; GENTSCH, J.R.; ITURRIZA-GÓMARA, M.; JOHNE, R.; KIRKWOOD, C.D.; MARTELLA, V.; MERTENS, P.P.; NAKAGOMI, O.; PARREÑO, V.; RAHMAN, M.; RUGGERI, F.M.; SAIF, L.J.; SANTOS, N.; STEYER, A.; TANIGUCHI, K.; PATTON, J.T.; DESSELBERGER, U.; VAN RANST, M. Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the rotavirus classification working group (RCWG). **Archives of Virology**, v.156, n.8, p.1397-1413, 2011.

MATTHIJNSSENS, J.; OTTO, P.H.; CIARLET, M.; DESSELBERGER, U.; RANST, M.V.; JOHNE, R. VP6-sequence-based cutoff values as a criterion for rotavirus species demarcation. **Archives of Virology**, v.157, p.1177-1182, 2012.

MAWATARI, T.; TANEICHI, A.; KAWAGOE, T.; HOSOKAWA, M.; TOGASHI, K.; TSUNEMITSU, H. Detection of bovine group C rotavirus from adult cows with diarrhea and reduced milk production. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.66, p. 887-890, 2004.

McNULTY, M.S.; CURRAN, W.L.; TODD, D.; MCFERRAN, J.B. Detection of viruses in avian faeces by direct electron microscopy. **Avian Pathology**, v.8, p.239-247, 1979.

McNULTY, M.S.; TODD, D.; ALLAN, G.M.; MCFERRAN, J.B.; GREEN, J.A. Epidemiology of rotavirus infection in broiler chickens: recognition of four serogroups. **Archives of Virology**, v.81, p.113-121, 1984.

MEBUS, C.A.; UNDERDAHL, N.R.; RHODES, M.B.; TWIEHAUS, M.J. Calf diarrhea (scours): reproduced with a virus from a field outbreak. **University of Nebraska - Research Bull**, v.233, p.1-16, 1969.

- 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, 2010a.
- MÉDICI, K.C.; BARRY, A.; ALFIERI, A.F.; ALFIERI, A.A. VP6 gene diversity in Brazilian strains of porcine group C rotavirus. **Genetics and Molecular Research**, v.9, p.506-513, 2010b.
- MÉDICI, K.C.; BARRY, A.F.; ALFIERI, A.F.; ALFIERI, A.A. Porcine rotavirus groups A, B, and C identified by polymerase chain reaction in a fecal sample collection with inconclusive results by polyacrylamide gel electrophoresis. **Journal of Swine Health and Production**, v.19, n.3, p.146-150, 2011.
- MIELE, M.; WAQUIL, P.D. Dimensões econômicas e organizacionais da cadeia produtiva de carne suína. Concórdia: **Embrapa Suínos e Aves**, 2006.
- MINAMOTO, N.; OKI, K.; TOMITA, M.; KINJO, T.; SUZUKI, Y. Isolation and characterization of rotavirus from feral pigeon in mammalian cell cultures. **Epidemiology and Infection**, v.100, p.481-492, 1988.
- NAGASHIMA, S.; KOBAYASHI, N.; ISHINO, M.; ALAM, M.M.; AHMED, M.U.; PAUL, S.K.; GANESH, B.; CHAWLA-SARKAR, M.; KRISHNAN, T.; NAIK, T.N.N.; WANG, Y.H. Whole genomic characterization of a human rotavirus strain B219 belonging to a novel group of the genus *Rotavirus*. **Journal of Medical Virology**, v.80, p.2023–33, 2008.
- 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.
- OTTO, P.; SCHULZE, P.; HERBST, W. Demonstration of group C rotaviruses in fecal samples of diarrheic dogs in Germany. **Archives of Virology**, v.144, p.2467-2473, 1999.
- OTTO, P.; LIEBLER-TENORIO, E.M.; ELSCHNER, M.; REETZ, J.; LOHREN, U.; DILLE, R. Detection of rotaviruses and intestinal lesions in broiler chicks from flocks with runting and stunting syndrome (RSS). **Avian Diseases**, v.50, p.411-418, 2006.
- OTTO, P.H.; AHMED, M.U.; HOTZEL, H.; MACHNOWSKA, P.; REETZ, J.; ROTH, B.; TROJNAR, E.; JOHNE, R. Detection of avian rotaviruses of groups A, D, F and G in diseased chickens and turkeys from Europe and Bangladesh. **Veterinary Microbiology**, v.156, p.8-15, 2012.
- PANTIN-JACKWOOD, M.J.; SPACKMAN, E.; DAY, J.M.; RIVES, D. Periodic monitoring of commercial turkeys for enteric viruses indicates continuous presence of astrovirus and rotavirus on the farms. **Avian Diseases**, v.51, p.674-680, 2007.
- PAUL, P.S.; LYOO, Y.S. Immunogens of Rotaviruses. **Veterinary Microbiology**, v.37, p.299-317, 1993.
- PAPP, H.; AL-MUTAIRI, L.Z.; CHEHADEH, W.; FARKAS, S.L.; LENGYEL, G.; JAKAB, F.; MARTELLA, V.; SZÚCS, G.; BÁNYAI, K. Novel NSP4 Genotype in a camel G10P[15] rotavirus strain. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, v. 59, p.411-421, 2012.

PAPP, H.; BORZÁK, R.; FARKAS, S.; KISFALI, P.; LENGYEL, G.; MOLNÁR, P.; MELEGH, B.; MATTHIJNSSENS, J.; JAKAB, F.; MARTELLA, V.; BÁNYAI, K. Zoonotic transmission of reassortant porcine G4P[6] rotaviruses in Hungarian pediatric patients identified sporadically over a 15 year period. **Infection, Genetics and Evolution**, v.19, p.71-80, 2013a.

PAPP, H.; LÁSZLÓ, B.; JAKAB, F.; GANESH, B.; DE GRAZIA, S.; MATTHIJNSSENS, J.; CIARLET, M.; MARTELLA, V.; BÁNYAI, K. Review of group A rotavirus strains reported in swine and cattle. **Veterinary Microbiology**, v.165, p.190-199, 2013b.

PEDLEY, S.; BRIDGER, J.C.; BROWN, J.F.; McCRAE, M.A. Molecular characterization of rotavirus with distinct group antigens. **Journal of General Virology**, v.64, p.2093-2101, 1983.

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.

PEDRIC, M.; MAYUR, K.; VONDERFECHT, S.; EIDEN, J.J. Comparison of group B rotavirus gene 9 and 11. **Journal of General Virology**, v.72, p.2801-2804, 1991.

PEREIRA, H.G.; LEITE, J.P.G.; AZEREDO, R.S.; FARIAS, V.; SUTMOLLER, F. Na atypical rotavirus detected in a child with gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.78, p.245-250, 1983.

PONGSUWANNA, Y.; TANIGUCHI, K.; CHIWAKUL, M.; URASAWA, T.; WAKASUGI, F.; JAYAVASU, C.; URASAWA, S. Serological and genomic characterization of porcinerotaviruses in Thailand: Detection of a G10 porcine rotavirus. **Journal of Clinical Microbiology**, v.34, n.5, p.1050-1057, 1996.

RAHMAN, M.; BANIK, S.; FARUQUE, A.S.; TANIGUCHI, K.; SACK, D.A.; VAN RANST, M.; AZIM, T. Detection and characterization of human group C rotaviruses in Bangladesh. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, p.4460-4465, 2005.

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

REYNOLDS, D.L.; THEIL, K.W.; SAIF, Y.M. Demonstration of rotavirus and rotavirus-like virus from the intestinal contents of diarrheic pheasant chicks. **Avian Diseases**, v.31, p.376-379, 1987.

RODGER, S.M.; BISHOP, R.F.; HOLMES, I.H. Detection of a rotavirus-like agent associated with diarrhea in an infant. **Journal of Clinical Microbiology**, v.16, p.724-726, 1982.

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.

SAIF, L.J.; BOHL, E.H.; THEIL, K.W.; CROSS, R.F.; HOUSE, J.A. Rotavirus-like, calicivirus-like, and 23-nm virus-like particles associated with diarrhea in young pigs. **Journal of Clinical Microbiology**, v.12, p.105-111, 1980.

SAIF, L.J.; JIANG, B. In: Nongroup A rotaviruses of humans and animals. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v.185, p.339–371, 1994.

SANEKATA, T.; KUWAMOTO, Y.; AKAMATSU, S.; SAKON, N.; OSETO, M.; TANIGUCHI, K.; NAKATA, S.; ESTES, M.K. Isolation of group B porcine rotavirus in cell culture. **Journal of Clinical Microbiology**, v.34, p.759–61, 1996.

SANEKATA, T.; AHMED, M.U.; KADER, A.; TANIGUCHI, K.; KOBAYASHI, N. Human group B rotavirus infections cause severe diarrhea in children and adults in Bangladesh. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, p.2187-2190, 2003.

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, J.S.; ALFIERI, A.F.; LEITE, J.P.G.; SKRABA, I.; ALFIERI, A.A. Molecular epidemiology of human group A rotavirus in Paraná state, Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.51, p.287-294, 2008.

SCHNAGL, R.D.; BONIFACE, K.; CARDWELL, P.; McCARTHY, D.; ONDRACEK, C.; COULSON, B.; ERLICH, J.; MOREY, F. Incidence of group C human rotavirus in central Australia and sequence variation of the VP7 and VP4 genes. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, p.2127-2133, 2004.

SHEN, S.; MCKEE, T.A.; WANG, Z.D.; DESSELBERGER, U.; LIU, D.X. Sequence analysis and in vitro expression of genes 6 and 11 of ovine group B rotavirus isolate, KB63: evidence for a non-defective, C-terminally truncated NSP1 and a phosphorylated NSP5. **Journal of General Virology**, v.80, p.2077-2085, 1999.

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.

SUZUKI, T.; KUGA, K.; MIYAZAKI, A.; TSUNEMITSU, H. Genetic divergence and classification of non-structural protein 1 among porcine rotaviruses of species B. **Journal of General Virology**, v.92, p.2922–2929, 2011.

SUZUKI, T.; SOMA, J.; KUGA, K.; MIYAZAKI, A.; TSUNEMITSU, H. Sequence and phylogenetic of nonstructural protein 2 genes of species B porcine rotaviruses in Japan during 2001-2009. **Virus Research**, v.165, p.46-51, 2012a.

SUZUKI, T.; SOMA, J.; MIYAZAKI, A.; TSUNEMITSU, H. Phylogenetic analysis of nonstructural protein 5 (NSP5) gene sequences in porcine rotavirus B strains. **Infection, Genetics and Evolution**, v.12, p.1661-1668, 2012b.

TAKASE, K.; UCHIMURA, T.; KATSUKI, N.; YAMAMOTO, M.A. Survey of chickens sera for antibody to atypical avian rotavirus of duck origin in Japan. **Jpn. Journal of Veterinary Science**, v.52, p.1319-1321, 1990.

TAKEHARA, K.; KIUCHI, H.; KUWAHARA, M.; YANAGISAWA, F.; MIZUKAMI, M.; MATSUDA, H.; YOSHIMURA, M. Identification and characterization of a plaque forming

avian rotavirus isolated from a wild bird in Japan. **Journal of Veterinary Science**, v.53, p.479-486, 1991.

TERRETT, L.A.; SAIF, L.A.; THEIL, K.W.; KOHLER, E.M. Physicochemical characterization of porcine pararotavirus and detection of virus and viral antibodies using cell culture immunofluorescence. **Journal of Clinical Microbiology**, v.25, p.268-272, 1987.

THEIL, K.W.; SAIF, L.J. In vitro detection of porcine rotavirus like (group B rotavirus) and its antibody. **Journal of Clinical Microbiology**, v.21, n.5, p.844-846, 1985.

THEIL, K.W.; REYNOLDS, D.L.; SAIF, Y.M. Comparison of immune electron microscopy and genome electropherotyping techniques for detection of turkey rotaviruses and rotaviruslike viruses in intestinal contents. **Journal of Clinical Microbiology**, v.23, p.695-699, 1986.

TORRES-MEDINA, A. Isolation of an atypical rotavirus causing diarrhea in neonatal ferrets. **The Journal of American Association of Laboratory Animal Science**. v.37, p.167-171, 1987.

TROJNAR, E.; OTTO, P.; ROTH, B.; REETZ, J.; JOHNE, E. The genome segments of a group D rotavirus possess group A-like conserved termini but encode group-specific proteins. **Journal of Virology**, v.84, p.10254-10265, 2010.

TROJNAR, E.; SACHSENRODER, J.; TWARDZIOK, S.; REETZ, J.; OTTO, P.H.; JOHNE, R. Identification of an avian group A rotavirus containing a novel VP4 gene with a close relationship to those of mammalian rotaviruses. **Journal of General Virology**, v.94, p.136-142, 2013.

TSUNEMITSU, H.; SAIF, L.J.; JIANG, B.M.; SHIMIZU, M.; HIRO, M.; YAMAGUCHI, H.; ISHIYAMA, T.; HIRAI, T. Isolation, characterization, and serial propagation of a bovine group C rotavirus in a monkey kidney cell line (MA104). **Journal of Clinical Microbiology**, v.29, p.2609-2613, 1991.

TSUNEMITSU, H.; MORITA, D.; TAKAKU, H.; NISHIMORI, T.; IMAI, K.; SAIF, L.J. First detection of bovine group B rotavirus in Japan and sequence of its VP7 gene. **Archives of Virology**, v.144, p.805-815, 1999.

UTRERA, V.; DE ILJA, R.M.; GORZIGLIA, M.; ESPARZA, J. Epidemiological aspects of porcine rotavirus infection in Venezuela. **Research in Veterinary Science**, v.36, p.310-315, 1984.

YAMAMOTO, D.; GHOSH, S.; KUZUYA, M.; WANG, Y.H.; ZHOU, X.; CHAWLA-SARKAR, M.; PAUL, S.K.; ISHINO, M.; KOBAYASHI, N. Whole-genome characterization of human group C rotaviruses: Identification of two lineages in the VP3 gene. **Journal of General Virology**, v.92, p.361-369, 2011.

YANG, H.; CHEN, S.; JI, S.; MENG, Z.; KANG, Z.; ZHANG, Z.; QI, S. A novel rotavirus causing large scale adult diarrhoea in Shi Jiazhuang. **Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi (Chinese Epidemiology)**, v.19, p.336-338, 1998 (in Chinese; English Abstract).

YANG, H.; MAKEYEV, E.V.; KANG, Z.; JI, S.; BAMFORD, D.H.; DIJK, V.A.A. Cloning and sequence analysis of dsRNA segments 5, 6 and 7 of a novel non-group A, B, C adult

rotavirus that caused an outbreak of gastroenteritis in China. **Virus Research**, v.106, p.15–26, 2004.

WAKUDA, M.; IDE, T.; SASAKI, J.; KOMOTO, S.; ISHII, J.; SANEKATA, T.; TANIGUCHI, K. Porcine rotavirus closely related to novel group of human rotaviruses. **Emerging Infectious Disease**, v.17, p.1491–1493, 2011.

WIELER, L.H.; ILIEFF, A.; HERBEST, W.; BAUER, C.; VIELER, E.; BAUERFEIND, R.; FAILIN, K.; KLOS, H.; WENGERT, D.; BALJER, G.; ZAHNER, H. Prevalence of enteropathogens in suckling and weaned piglets with diarrhoea in Southern Germany. **Journal of Veterinary Medicine B**, v.48, p.151-159, 2001.

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. OBJETIVOS

---

### 2.1 OBJETIVO GERAL

- Realizar análises moleculares no gene NSP2 de amostras de rotavírus com perfil eletroforético semelhante aos rotavírus grupo B identificadas em um surto de diarreia de pré e pós-desmame em leitões de um rebanho do estado do Mato Grosso do Sul.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever a identificação de rotavírus grupo H em suínos no Brasil;
- Amplificar por meio da técnica de RT-PCR fragmentos com 1234 pb do gene VP6 de rotavírus suíno identificados como pertencentes ao grupo H;
- Determinar as sequências de nucleotídeos dos produtos do gene VP6 amplificados por RT-PCR das amostras de RVH;
- Determinar a filogenia molecular das cepas de RVH identificadas comparando-as com outras disponíveis em bases públicas de dados.



**Species H Rotavirus Detected in Piglets with Diarrhea, Brazil, 2012<sup>1</sup>**

---

<sup>1</sup> Artigo editado de acordo com as normas de publicação da revista *Emerging Infectious Diseases*.  
Disponível em: <http://wwwnc.cdc.gov/eid/pages/manuscript-preparation.htm>

-----Mensagem Original-----

From: eidchief@cdc.gov  
Sent: Wednesday, March 05, 2014 6:38 PM  
To: alfieri@uel.br  
Subject: Disposition for Manuscript # EID-13-0776.R2

05-Mar-2014

Dear Prof. Alfieri:

We are pleased to inform you that your article "Rotavirus of species H detected in piglets with diarrhea in Brazil, 2012" has been accepted for publication in Emerging Infectious Diseases. The article will undergo substantive editing for length, grammatical correctness, and journal style. The galleys will be sent to you for approval.

Thank you for sending us your article. We look forward to working with you in the months to come.

Dr. D. Peter Drotman  
Editor-in-Chief  
Emerging Infectious Diseases  
eidchief@cdc.gov  
404-639-1960 (phone)  
404-639-1954 (fax)

**Running Title:** SpH Rotavirus, Brazil

**Keywords:** pigs, piglets, diarrhea, viruses, group H rotavirus, species H Rotavirus, *Reoviridae*, porcine rotavirus, Brazil.

**Title:** Species H Rotavirus Detected in Piglets with Diarrhea, Brazil, 2012

**Authors:** Bruna L. D. Molinari, Elis Lorenzetti, Rodrigo A. A. Otonel, Alice F. Alfieri, and Amauri A. Alfieri

**Affiliations:** Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Parana, Brazil (B. L. D. Molinari, E. Lorenzetti, R. A. A. Otonel, A. F. Alfieri, A. A. Alfieri)

**Suggested citation for this article:** Molinari BLD, Lorenzetti E, Otonel RAA, Alfieri AF, Alfieri AA. Species H rotavirus detected in piglets with diarrhea, Brazil, 2012. *Emerg Infect Dis.* 2014 Jun [*date cited*]. <http://dx.doi.org/10.3201/eid2006.130776>

**Abstract - 43 words**

We determined nucleotide and deduced amino acid sequences of the rotavirus gene encoding VP6 from 3 fecal samples collected from diarrheic piglets in Brazil, 2012. The analyses showed that the Brazilian porcine rotavirus strains are closely related to the novel species H rotavirus.

**Text – 1138 words**

Rotaviruses (RVs), form a genus of the family *Reoviridae*, and are a common cause of viral gastroenteritis in humans and animals (1). The RV genome consists of 11 segments of double-stranded RNA that encode 6 structural (VP1-VP4, VP6, and VP7) and 6 non-structural proteins (NSP1-NSP6) (1). RVs have been classified into 7 species, which are also known as groups, termed A-G, on the basis of the antigenicity and genetic characteristics of VP6 (2, 3). Species A RV (RVA) infections cause severe diarrhea in infants and young children worldwide but can also infect adults, other mammals, and birds (1). Species B RV (RVB) infections were first associated with cases of severe diarrhea in adults (4), and have also been detected in cattle, pigs, sheep, and rats (5-7).

In addition to the 7 established species of RV, Matthijnsens et al. (2) recently proposed the new RV species H (RVH) based on VP6 sequence analysis. Included in this species are the novel adult diarrhea rotavirus strain (ADRV-N) isolated from specimens collected during an outbreak of adult gastroenteritis in 1997 in China (8), strain J19, identified during the same outbreak in China in 1997 (9), the human RV B219, detected in a sporadic case of diarrhea in Bangladesh during 2002 (10, 11), and the porcine RV strain SKA-1 that was isolated from a pig with diarrhea in Japan (12).

In this study, we determined the VP6 nucleotide (nt) sequence for 3 RV-positive fecal samples obtained from piglets with diarrhea in Mato Grosso do Sul, Brazil, in 2012. A comparative analysis with other VP6 genes showed that the porcine RV strain from Brazil is closely related to the novel species H rotavirus.

A molecular study of RVB infection on a pig farm in Mato Grosso do Sul in the Central-West region of Brazil was performed during an outbreak of diarrhea in 2012. A total of 59 diarrheic stool specimens were collected from 12-35 day-old piglets, and the presence of RV was investigated by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) (13). Eight samples that showed species B dsRNA pattern (4:2:2:3) and 2 that showed PAGE-inconclusive results were subjected to RT-PCR by using the primer pair described by Gouvea et al. (14), which were designed to amplify a partial fragment of the NSP2 gene of RVB. All 10 samples were positive for RVB based on the amplification of the 434 bp target fragment. To amplify larger fragments of the distinctive RVB NSP2 gene, the 10 fecal samples were submitted to RT-PCR using the primer pairs NSP2-1 F/R (993 bp) and NSP2-2 F/R (938 bp) as described by Suzuki et al. (15). Products of 993 bp expected for amplification reaction with NSP2-1 primer pair were obtained for 7 of the samples. The remaining 3 samples (BR59, BR60, and BR63), of 35 day-old piglets did not generate the expected fragments with any of the primer pairs. However, because of an unexpected annealing of NSP2-2 primer pair in RT-PCR, shorter (~750 bp) amplicons were generated for these 3 samples.

The nonspecific amplification products of the 3 samples were purified and sequenced with NSP2-2 forward and reverse primers, using the BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Reaction Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) on an automated sequencer (ABI3500). Similarity searches were performed with sequences deposited in GenBank by using BLAST software. Of note, the highest nt identities were obtained for the VP4 genes of the RVH strains SKA-1 (89%), B219 (72%), and J19 (70%). The VP4 nt sequence alignment of the RVH SKA-1 strain and the nonspecific product was performed from the nt position 1792 to 2433 using MEGA (version 6).

To confirm the similarity of the samples BR59, BR60, and BR63 with RVs of species H, an additional set of RT-PCRs were performed by using 2 new primer pairs designed based on the complete sequence of the VP6 gene of the porcine RVH strain SKA-1 (12) (Table 1). Phylogenetic analysis and nt distance calculations were performed using MEGA (v.6) and BioEdit (version 7.0.8.0) software.

The pairwise comparisons of the VP6 nt and inferred amino acid (aa) sequences of the 3 specimens revealed 100% nt and aa identities among them. In contrast, the BR59, BR60, and BR63 sequences showed <36% nt identity (< 13.5% aa identity) with cognate sequences of species A, C, D, and F RVs, and 49.7-51.6% nt identity (35.8-38.3% aa identity), respectively, with RVB and RVG species. The specimens had relatively high identities with RVH (71.7-85.5% and 75.7-96.9% at the nt and aa levels, respectively). The highest identity was shared with the VP6 gene of the porcine RVH SKA-1 strain (Table 2). The phylogenetic tree (Figure) inferred from the VP6 sequences was separated into distinct phylogenetic clusters representative of RV species. The BR59, BR60, and BR63 samples grouped closest to the RVH species. Although they segregated in a different branch, they clearly were within the RVH cluster.

## Conclusions

The 3 RV BR59, BR60, and BR63 detected in diarrheic specimens from 35-day-old piglets from the same farm shared 100% nt and aa identities of their VP6 gene sequences, suggesting that the specimens represented the same local RV strain. Although initial RT-PCR results using RVB-specific NSP2 primers suggested that these samples were RVB, sequence analysis of the VP6 gene showed that they are different from RVB.

Matthijnsens et al. (2) proposed a 53% aa cutoff value for VP6 to be used for the differentiation of distinct RV species. The 3 RV samples included in this study showed a VP6 aa identity ranging 76.1% (human strain) to 96.9% (porcine strain) when compared with RVH and are thus considered to belong to the novel species RVH. Prior to this study, 1 porcine RVH strain (SKA-1), detected in Japan, had been reported (2, 12).

The VP6 nt and aa sequences of BR59, BR60, and BR63 samples did not show high identities with VP6 sequences from RV species A, C, D, and F, but showed a moderate level of relatedness to VP6 sequences of species RVB, in agreement with previous reports (10, 12). Of note, BR59, BR60, and BR63 sequences shared high similarities with an RVG strain found in chickens, in both nt (51.6%) and aa (38.3%) levels, compared with RVB.

This similarity is also evident in the phylogenetic tree, in which these 3 samples cluster closer to RVG and RVB than to the other species RV.

Our study reports the detection of a porcine RVH from the Americas. With the exception of porcine strain SKA-1 isolated in Japan, there have been no other previous reports of porcine RVH. Very little information is available regarding this new RV species, members of which infect humans and piglets. To date, these viruses have only been detected in China, Bangladesh, Japan, and now in Brazil. The scarcity of molecular and epidemiologic information on these viruses may be a result of lack of appropriate diagnostic tools. Extensive epidemiologic studies are needed to determine the worldwide dissemination and prevalence of this RV species and its effects on diarrheal diseases.

### **Acknowledgments**

This work was supported by the Brazilian Institutes National Council of Technological and Scientific Development (CNPq), Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), and Araucária Foundation (FAP/PR). A. A. Alfieri, A. F. Alfieri, and E. Lorenzetti are the recipients of CNPq fellowships.

### **Author Bio**

Ms Molinari is a graduate student at Universidade Estadual de Londrina, Brazil. Her research interest is the genomic characterization of rotavirus.

### **References**

- 1 Estes MK, Kapikian AZ. Rotaviruses. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Martin MA, Lamb RA, Roizman B, Straus SE, editors. *Fields Virology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2007;1917-74.
- 2 Matthijnssens J, Otto PH, Ciarlet M, Desselberger U, Ranst MV, Johne R. VP6-sequence-based cutoff values as a criterion for rotavirus species demarcation. *Arch Virol*. 2012;157:1177-82. PubMed: <http://dx.doi.org/10.1007/s00705-012-1273-3>
- 3 Kindler E, Trojnar E, Heckel G, Otto PH, Johne R. Analysis of rotavirus species diversity and evolution including the newly determined full-length genome sequences of rotavirus F and G. *Infect Genet Evol*. 2013;14:58-67. PubMed: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2012.11.015>

- 4 Hung T, Wang CG, Fang ZY, Chou ZY, Chang XJ, Liong XQ, et al. Waterborne outbreak of rotavirus diarrhoea in adults in China caused by a novel rotavirus. *The Lancet*. 1984;323:1139-42. PubMed: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(84\)91391-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(84)91391-6)
- 5 Eiden JJ, Nataro J, Vonderfecht S, Petric M. Molecular cloning, sequence analysis, in vitro expression, and immunoprecipitation of the major inner capsid protein of the IDIR strain of group B rotavirus (GBR). *Virology*. 1992;188:580-89. PubMed: [http://dx.doi.org/10.1016/0042-6822\(92\)90512-N](http://dx.doi.org/10.1016/0042-6822(92)90512-N)
- 6 Chang KO, Parwani AV, Smith D, Saif LJ. Detection of group B rotaviruses in fecal samples from diarrheic calves and adult cows and characterization of their VP7 genes. *J Clin Microbiol*. 1997;35:8:2107-10. PubMed.
- 7 Kuga K, Miyazaki A, Suzuki T, Takagi M, Hattori N, Katsuda K, et al. Genetic diversity and classification of the outer capsid glycoprotein VP7 of porcine group B rotaviruses. *Arch Virol*. 2009;154:1785-95. PubMed: <http://dx.doi.org/10.1007/s00705-009-0517-3>
- 8 Yang H, Makeyev EV, Kang Z, Ji S, Bamford DH, van Dijk AA. Cloning and sequence analysis of dsRNA segments 5, 6 and 7 of a novel non-group A, B, C adult rotavirus that caused an outbreak of gastroenteritis in China. *Virus Res*. 2004;106:15-26. PubMed: <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2004.05.011>
- 9 Jiang S, Ji S, Tang O, Cui X, Yang H, Kan B, et al. Molecular characterization of a novel adult diarrhea rotavirus strain J19 isolated in China and its significance for the evolution and origin of group B rotaviruses. *J Gen Virol*. 2008;89:2622-29. PubMed: <http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.2008/001933-0>
- 10 Alam MM, Kobayashi N, Ishino M, Ahmed MS, Ahmed MU, Paul SK, et al. Genetic analysis of an ADRV-N-like novel rotavirus strain B219 detected in a sporadic case of adult diarrhea in Bangladesh. *Arch Virol*. 2007;152:199-208. PubMed: <http://dx.doi.org/10.1007/s00705-006-0831-y>
- 11 Nagashima S, Kobayashi N, Ishino M, Alam MM, Ahmed MU, Paul SK, et al. Whole genomic characterization of a human rotavirus strain B219 belonging to a novel group of the genus Rotavirus. *J Med Virol*. 2008;80:2023-33. PubMed: <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.21286>
- 12 Wakuda M, Ide T, Sasaki J, Komoto S, Ishii J, Sanekata T, et al. Porcine rotavirus closely related to novel group of human rotaviruses. *Emerg Infect Dis*. 2011;17:1491-93. PubMed.
- 13 Herring AJ, Inglis NF, Ojeh CK, Snodgrass DR, Menzies JD. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. *J Clin Microbiol*. 1982;16:473-77. PubMed.
- 14 Gouvea V, Allen JR, Glass RI, Fang ZY, Bremont M, Cohen J, et al. Detection of group B and C rotaviruses by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*. 1991;29:519-23. PubMed.
- 15 Suzuki T, Soma J, Kuga K, Miyazaki A, Tsunemitsu H. Sequence and phylogenetic analyses of nonstructural protein 2 gene of species B porcine rotaviruses detected in Japan

during 2001-2009. *Virus Res.* 2012;165:46-51. PubMed:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2012.01.003>

Address for correspondence: : Amauri A. Alfieri, Laboratory of Animal Virology, Department of Veterinary Preventive Medicine, Universidade Estadual de Londrina, P.O. Box 10011, 86057-970, Londrina, Parana, Brazil; Tel.: +55 43 33715876; Fax: +55 43 33714485; email: [alfieri@uel.br](mailto:alfieri@uel.br)

**Table 1** –Oligonucleotide primers designed from the VP6 gene of the SKA-1 RV strain for RT-PCR sequence analysis.

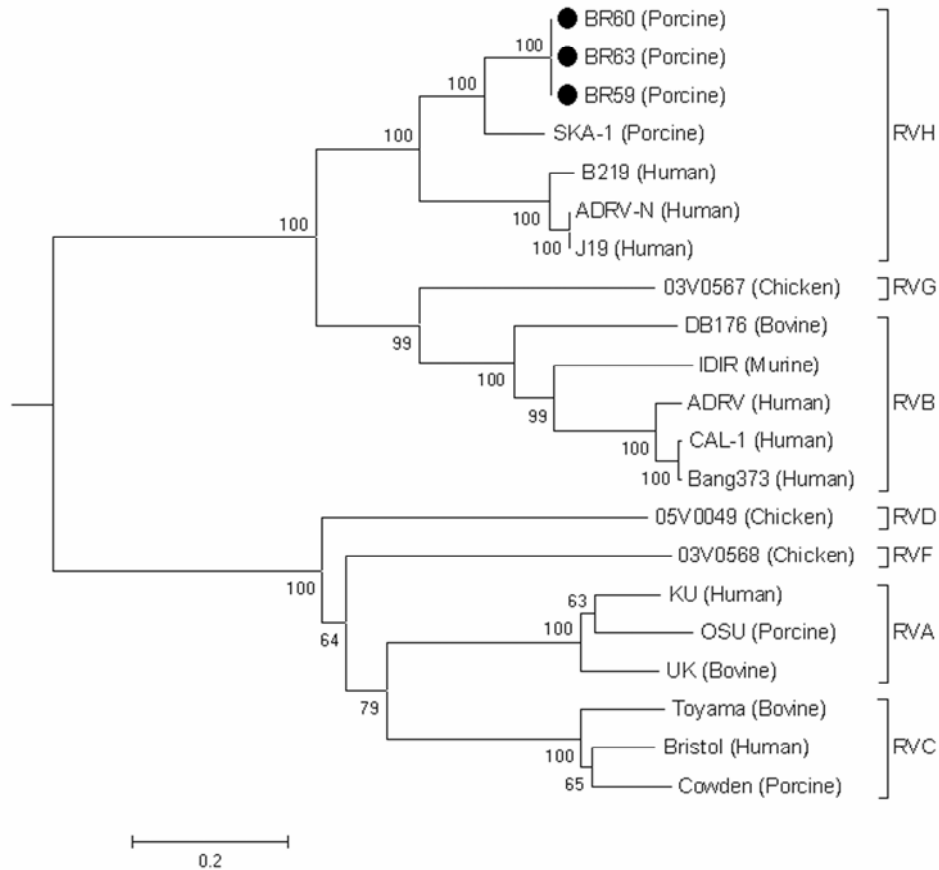
Primer	Sequence (5`-3`)	Nucleotide position
VP6/RVN-1F	TGCTACAAGTGACCCACAAGG	11-31
VP6/RVN-1R	GCCATCTTTCCAGTGGCTCT	581-600
VP6/RVN-2F	ACCAGGTGGAGCAACAAACA	529-548
VP6/RVN-2R	CAGTGCGTGACCAGATCTCA	1225-1244

**Table 2** –Identities of nucleotide and amino acid VP6 gene sequences (nt 24 to 1221) of the porcine rotavirus samples BR59, BR60, and BR63 compared with the VP6 sequences from representative RV strains of different species\*.

Species	Rotavirus	% identity of nucleotide (amino acid) sequences
	Strain (species origin)	
A	KU (human)	35.6 (11)
	UK (bovine)	35.2 (11.2)
	OSU (porcine)	34.7 (11.7)
B	ADRV (human)	51.4 (35.8)
	CAL-1 (human)	50.7 (36.8)
	Bang 373 (human)	51 (36.3)
	DB176 (bovine)	49.7 (37.9)
	IDIR (murine)	50.2 (37.4)
C	Bristol (human)	35 (8.7)
	Toyama (bovine)	34.5 (9)
	Cowden (porcine)	34.7 (8.5)
D	05V0049 (chicken)	35.2 (13.2)
F	03V0568 (chicken)	35.5 (10)
G	03V0567 (chicken)	51.6 (38.3)
H	ADRV-N (human)	72.3 (76.4)
	B219 (human)	71.7 (76.2)
	J19 (human)	72.3 (75.7)
	SKA-1 (porcine)	85.5 (96.9)

\*The exact position of the 1,197 fragments of the porcine samples BR59, BR60, and BR63 VP6 gene entered into the phylogenetic comparison was based on the RVH SKA-1 VP6 complete gene. For GenBank accession numbers: BR59 (KF021619), BR60 (KF021620), BR63 (KF021621), KU (AB022768), UK (X53667), OSU (AF317123), ADRV (M55982), CAL-1 (AB037931), Bang 373 (AY238389), DB176 (GQ358713), IDIR (M84456), Bristol (X59843), Toyama (AB738416), Cowden (M94157), 05V0049 (GU733448), 03V0568 (HQ403603), 03V0567 (HQ403604), ADRV-N (AY632080), B219 (DQ168033), J19 (DQ113902), and SKA-1 (AB576626).

**Figure** – Phylogenetic tree showing the inferred evolutionary relationships among representative rotavirus strains belonging to species A, B, C, D, F, G, and H, as well as the samples BR59, BR60, and BR63 based on an 1,197 bp fragment of the VP6 gene.



The tree was constructed by using the neighbor-joining method and the Kimura 2-parameter nucleotide substitution model. Bootstrapping was statistically supported with 1,000 replicates. Scale bars indicates nucleotide substitutions per site. The VP6 gene sequences of the following strains were obtained from the GenBank database (accession nos.): BR59 (KF021619), BR60 (KF021620), BR63 (KF021621), KU (AB022768), UK (X53667), OSU (AF317123), ADRV (M55982), CAL-1 (AB037931), Bang373 (AY238389), DB176 (GQ358713), IDIR (M84456), Bristol (X59843), Toyama (AB738416), Cowden (M94157), 05V0049 (GU733448), 03V0568 (HQ403603), 03V0567 (HQ403604), ADRV-N (AY632080), B219 (DQ168033), J19 (DQ113902), and SKA-1 (AB576626).



#### 4. CONCLUSÕES

---

- Este é o primeiro estudo realizado no Brasil descrevendo a presença de RVH em rebanho suíno;
- A RT-PCR com *primers* para o gene VP6 de RVH possibilitou a amplificação de um produto com 1234 pb para as três amostras brasileiras incluídas neste estudo;
- A análise filogenética das sequências de nucleotídeos do gene VP6 possibilitou a confirmação de que as amostras BR59, BR60 e BR63 pertencem aos RVH.



## 5. PERSPECTIVAS

---

### 5.1 MOLECULAR:

- Sequenciar o genoma completo de RVH;
- Estabelecer a relação genética entre RVH, RVB e RVG.

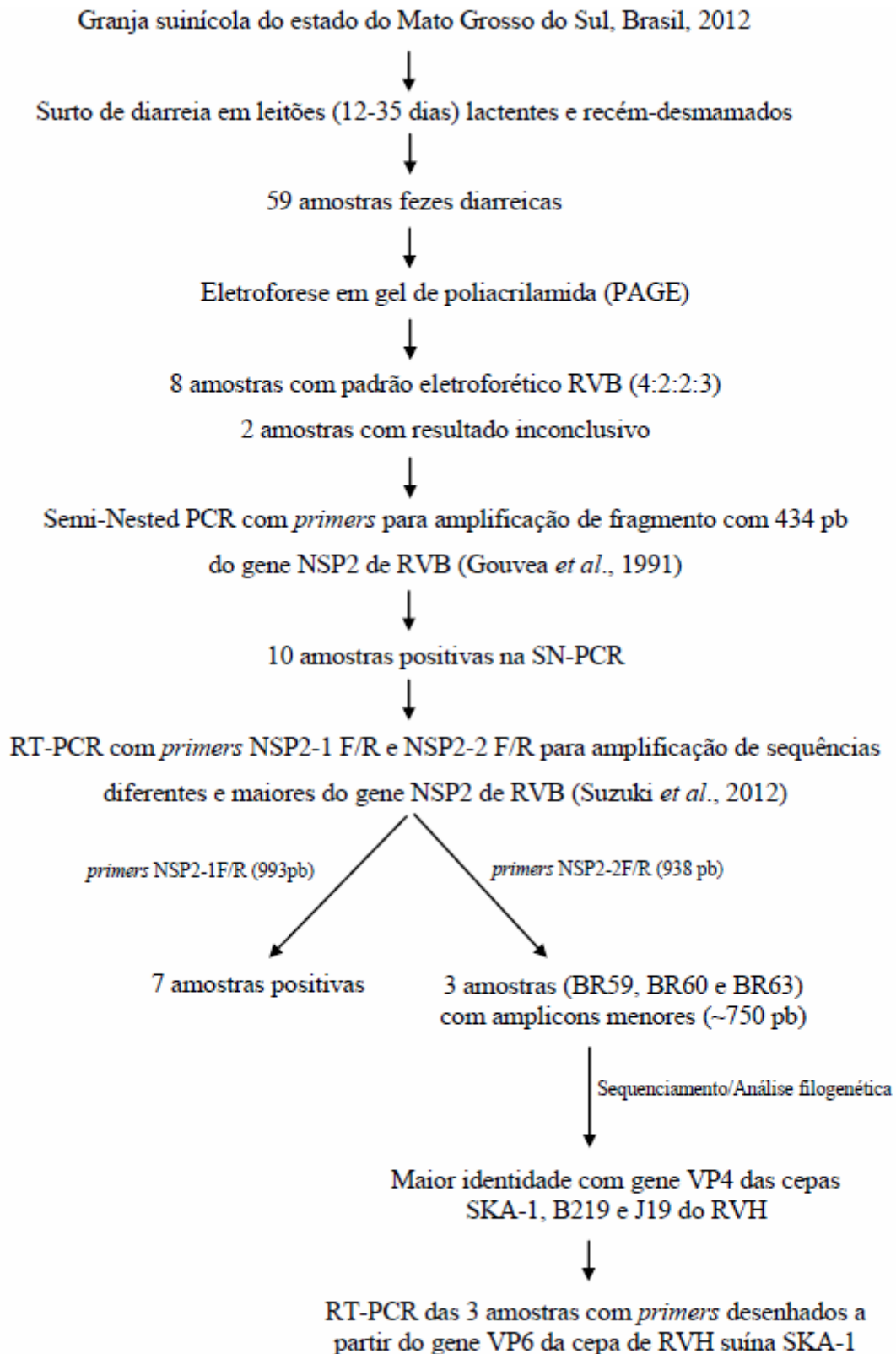
### 5.2 EPIDEMIOLÓGICA:

- Análise retrospectiva e prospectiva de cepas de RVB identificadas no Laboratório de Virologia Animal / UEL com o objetivo de identificar novos RVH e descrever a frequência de ocorrência desse grupo de RV em episódios de diarreia neonatal suína.



## APÊNDICE A

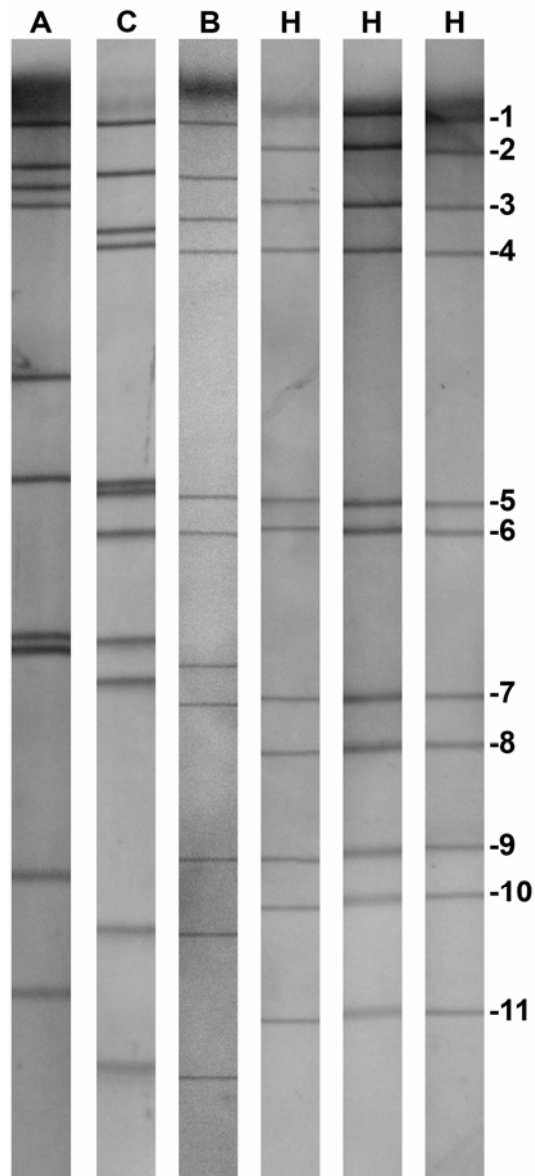
## Fluxograma do desenvolvimento do trabalho



## APÊNDICE B

Perfil de migração em eletroforese em gel de poliacrilamina 7,5%, visualizado por coloração com nitrato de prata, do dsRNA de RV grupos A, C e B e o identificado nas amostras fecais (BR59, BR60 e BR63) diarreicas de suínos caracterizadas como RVH

---





## ANEXO A

## Lista de Reagentes

- 
1. 100 mM dNTP *Set*, 4 x 250  $\mu$ L; 25  $\mu$ mol cada (100 mM dATP *Solution*, 100 mM dCTP *Solution*, 100 mM dGTP *Solution*, 100 mM dTTP *Solution*) (*Invitrogen<sup>TM</sup> Life Technologies, EUA*)
  2. 10 x PCR-*Buffer* (200 mM Tris-HCl, pH 8,4, 500 mM KCl) (*Invitrogen<sup>TM</sup> Life Technologies, EUA*)
  3. 123 bp DNA *Ladder* (*Invitrogen<sup>TM</sup> Life Technologies, EUA*)
  4. 2-Mercaptoetanol ( $C_2H_6O_5$ ) P.M. 78,13 (Fluka®)
  5. Acetona P.A. ( $CH_3COCH_3$ ) P.M. 58,08 (Dinâmica®)
  6. Ácido acético glacial P.A. ( $CH_3COOH$ ) P.M. 60,05 (Nuclear®)
  7. Ácido bórico ( $H_3BO_3$ ) P.M. 61,83 (Sicalab®)
  8. Ácido clorídrico (HCl) P.M. 36,46 (Reagen®)
  9. Ácido etilenodiaminotetraácido sal di-sódico - EDTA P.A. ( $C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O$ ) P.M. 372,24 (Reagen®)
  10. Acrilamida P.M. 71,08 (Gibco BRL®)
  11. Ágar Noble (Difco®)
  12. Agarose (*Invitrogen<sup>TM</sup> Life Technologies, EUA*)
  13. Água DEPC (Diethyl pirocarbonato) (*Invitrogen<sup>TM</sup> Life Technologies<sup>®</sup>, EUA*)
  14. Álcool etílico absoluto ( $C_2H_5OH$ ) P.M. 46,07 (Nuclear®)
  15. Álcool isoamílico ( $((CH_3)_2CHCH_2CH_2OH)$ ) P.M. 88,15 (Synth®)
  16. Azul de bromofenol (Sigma®, EUA)
  17. Bicarbonato de sódio P.A. ( $NaHCO_3$ ) P.M. 84,01 (Biotec®)
  18. *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit* (*Applied Biosystems<sup>®</sup>, EUA*)
  19. Bis-acrilamida P.M. 154,2 (Sigma®, EUA)
  20. Borohidreto de sódio P.M. 37,83 (Sigma®, EUA)
  21. Brometo de etídeo ( $C_{21}H_{20}N_3Br$ ) P.M. 394,3 (Sigma®, EUA)
  22. Cloreto de Cálcio Puro ( $CaCl_2$ ) P.M. 110,94 (*Invitrogen<sup>TM</sup> Life Technologies, EUA*)
  23. Cloreto de Potássio P.A. (KCl) P.M. 74,56 (Reagen®)

24. Cloreto de Sódio P.A. (NaCl) P.M. 58,45 (Reagen®)
25. Clorofórmio P.A. (CHCl<sub>3</sub>) P.M. 119,38 (Dinâmica®)
26. Dióxido de sílica (SiO<sub>2</sub>) P.M. 60,08 (Sigma®, EUA)
27. Dodecil Sulfato de Sódio - Lauril Sulfato de Sódio - SDS (C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>NaO<sub>4</sub>S) P.M. 288,38 (BDH)
28. Fenol (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>OH) P.M. 94,11 (*Invitrogen™ Life Technologies®*, EUA)
29. Fosfato de sódio dibásico anidro (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) P.M. 141,96 (Synth®)
30. Fosfato de sódio monobásico (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> . 2H<sub>2</sub>O) P.M. 155,99 (Reagen®)
31. Fosfato de sódio dihidratado (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> . 2H<sub>2</sub>O) P.M. 177,99 (Merck®)
32. GFX PCR DNA and *Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare, UK)
33. Glicina P.A. P.M. 75,07 (Nuclear®)
34. Glicose C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> P.M. 180,16 (Reagen®)
35. Hidróxido de Sódio P.A. (NaOH) P.M. 40,00 (*Mallinckrodt Chemicals®*)
36. Hidroximetil amino metano - TRIS 99% P.M. 121,14 (Merck)
37. Isotiocianato de guanidina P.M. 118,16 (*Invitrogen™ Life Technologies, EUA*)
38. Metanol, P.A. (CH<sub>3</sub>OH) P.M. 32,04 (Allkimia®)
39. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) B1 (NSP2/RVB) (forward; 5'-CTATTCAGTGTGTCGTGAGAGG -3') GOUVEA *et al.* (1991) - 200 pmol (*Invitrogen™ Life Technologies®*, EUA)
40. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) B4 (NSP2/RVB) (reverse; 5'-CGTGGCTTTGGAAAATTCTTG -3') GOUVEA *et al.* (1991) - 200 pmol (*Invitrogen™ Life Technologies®*, EUA)
41. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) B3 (NSP2/RVB) (reverse; 5'-CGAAGCGGGCTAGCTTGTCTGC -3') GOUVEA *et al.* (1991) - 200 pmol (*Invitrogen™ Life Technologies®*, EUA)
42. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) NSP2-1F (NSP2/RVB) (forward; 5'-TTGGTGTAGTGCGTCGTGAGA -3') SUZUKI *et al.* (2012) - 200 pmol (*Invitrogen™ Life Technologies®*, EUA)
43. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) NSP2-1R (NSP2/RVB) (reverse; 5'-GTATAGCGGATTTATCACAG -3') SUZUKI *et al.* (2012) - 200 pmol (*Invitrogen™ Life Technologies®*, EUA)

44. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) NSP2-2F (NSP2/RVB) (forward; 5'-TCACCCATCCCCTAGGTCA -3') SUZUKI *et al.* (2012) - 200 pmol (Invitrogen<sup>TM</sup> Life Technologies<sup>®</sup>, EUA)
45. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) NSP2-2R (NSP2/RVB) (reverse; 5'-GGGGTTTATCACAGTCTAC -3') SUZUKI *et al.* (2012) - 200 pmol (Invitrogen<sup>TM</sup> Life Technologies<sup>®</sup>, EUA)
46. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) VP6/RVN-1F (VP6/RVH) (forward; 5'-TGCTACAAGTGACCCACAAGG -3') – MOLINARI *et al.* (2014) - 200 pmol (Invitrogen<sup>TM</sup> Life Technologies<sup>®</sup>, EUA)
47. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) VP6/RVN-1R (VP6/RVH) (reverse; 5'-GCCATCTTTCCAGTGGCTCT -3') – MOLINARI *et al.* (2014) - 200 pmol (Invitrogen<sup>TM</sup> Life Technologies<sup>®</sup>, EUA)
48. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) VP6/RVN-2F (VP6/RVH) (forward; 5'-ACCAGGTGGAGCAACAAACA -3') – MOLINARI *et al.* (2014) - 200 pmol (Invitrogen<sup>TM</sup> Life Technologies<sup>®</sup>, EUA)
49. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) VP6/RVN-2R (VP6/RVH) (reverse; 5'-CAGTGCGTGACCAGATCTCA -3') – MOLINARI *et al.* (2014) - 200 pmol (Invitrogen<sup>TM</sup> Life Technologies<sup>®</sup>, EUA)
50. *Platinum Taq DNA Polymerase* 500 unidades (Invitrogen<sup>TM</sup> Life Technologies, BRA)
51. *Quant-iT<sup>TM</sup> Working Solution* (Invitrogen<sup>TM</sup> Life Technologies, EUA)
52. Sacarose, P.A. - sucrose (C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>) P.M. 342,31 (Reagen<sup>®</sup>)
53. *Superscript TM II RNase H - Reverse Transcriptase* – 200 unidades/μL (Invitrogen<sup>TM</sup> Life Technologies, EUA)
54. Triton x-100 (J.T.Baker<sup>®</sup>)

ANEXO B  
Soluções e Tampões

---

- **Hidratação da sílica: suspensão de sílica**
  - 6 g de sílica ( $O_2Si$ )
  - Adicionar 50 mL de água bidestilada
  - Agitar lentamente e manter em repouso durante 24 h
  - Por sucção, desprezar 44 mL do sobrenadante
  - Ressuspender a sílica em 50 mL de água bidestilada
  - Manter em repouso durante 5 h para sedimentar
  - Desprezar 44 mL do sobrenadante
  - Adicionar 100  $\mu$ L de HCl fumegante para ajustar o pH=2,0.
  - Aliquotar
  
- **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 de azul de bromofenol (0,25%)
  - 45 g de sacarose - sucrose ( $C_{12}H_{22}O_{11}$ ) (45%)
  - Água bidestilada q.s.p. 100 mL
  
- **Tampão de amostra para eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE)**
  - 0,2 mL de azul de bromofenol 1%
  - 6,0 mL de SDS 10%
  - 1 mL de 2-mercaptoetanol

- 2,5 mL de TRIS-HCl 0,5 M
- 6 g de ureia
- Água bidestilada q.s.p. 20 mL
  
- **Tampão de corrida: TBE (TRIS - Ácido bórico - EDTA) 10 x [ ]**
  - 107,78 g de 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 L
  
- **Tampão de corrida para PAGE**
  - 30 g de TRIS (0,24 M)
  - 14,4 g de ácido aminoacético (glicina) (NH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH) (0,19 M)
  - Água bidestilada q.s.p. 1 L
  
- **Tampão de estabilização para o rotavírus (TRIS/Ca<sup>++</sup>) 10 x - pH 7,2**
  - 12,12 g de TRIS (0,89 mM)
  - 2,2 g de cloreto de cálcio (1,5 mM)
  - Água bidestilada autoclavada q.s.p. 1 L
  
- **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 (C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>NaO<sub>4</sub>S)
  
  - Água bidestilada autoclavada q.s.p. 50 mL
  
- **Lower TRIS pH 8,8 para PAGE**
  - 36,34 g de TRIS (1,5 M)
  - Água bidestilada q.s.p. 200 mL

- **Upper TRIS pH 6,8 para PAGE**
  - 12,12 g de TRIS (0,5 M)
  - Água bidestilada q.s.p 200 mL
  
- **Solução Acrilamida / Bisacrilamida**
  - 1,3 g de bisacrilamida
  - 50 g de acrilamida
  - Água bidestilada q.s.p 100 mL
  
- **Solução fixadora para PAGE**
  - 30 mL de álcool etílico absoluto
  - 1,5 mL de ácido acético
  - Água bidestilada q.s.p. 300 mL
  
- **Solução de prata para PAGE**
  - 0,55 g de nitrato de prata
  - Água bidestilada q.s.p. 300 mL
  
- **Solução reveladora para PAGE**
  - 9 g de hidróxido de sódio
  - 2,5 mL de formaldeído
  
  - 0,06 g de borohidreto de sódio
  - Água bidestilada q.s.p. 300 mL
  
- **Solução stop da coloração para PAGE**
  - 15 mL de ácido acético P.A.
  - Água bidestilada q.s.p. 300 mL
  
- **Solução conservadora para PAGE**
  - 15 mL de álcool etílico P.A.
  - Água bidestilada q.s.p. 300 mL

- **Gel inferior (7,5%) da PAGE**
  - 5 mL de Lower TRIS
  - 3 mL de acrilamida/bisacrilamida
  - 50  $\mu$ L de TEMED
  - 560  $\mu$ L persulfato de amônio 2%
  - 11,44 mL de água bidestilada
  
- **Gel superior (3,5%) da PAGE**
  - 2,5 mL de Upper TRIS
  - 1 mL de acrilamida/bisacrilamida
  - 100  $\mu$ L de TEMED
  - 600  $\mu$ L de persulfato de amônio 2%
  - 6,20 mL de água bidestilada
  
- **Gel de agarose 2%**
  - 1 g de agarose
  
  - 50 mL de tampão TEB 1 x
  - 30  $\mu$ L de brometo de etídeo
  
- **Diluição de dNTP**
  - solução estoque - concentração 100 mM - 100  $\mu$ L de cada dNTP
  - solução uso - concentração 10 mM - 10  $\mu$ L da solução estoque + 90  $\mu$ L de água ultrapura
  
- **Diluição dos *primers***

SN-PCR NSP2/RVB

– *Primer B1 forward*

Concentração: 18,59 nmol

Data de fabricação: Mar. 2012

$$18,59 \times 1000 = 18590 \text{ pmol}$$

$$18590 / 200 = 92,95 \text{ } \mu\text{L água ultrapura}$$

– *Primer B4 reverse*

Concentração: 17,66 nmol

Data de fabricação: Jun. 2007

$$17,66 \times 1000 = 17660 \text{ pmol}$$

$$17660 / 200 = 88,3 \text{ } \mu\text{L água ultrapura}$$

– *Primer B3 reverse*

Concentração: 29,13 nmol

Data de fabricação: Jun. 2007

$$29,13 \times 1000 = 29130 \text{ pmol}$$

$$29130 / 200 = 145,65 \text{ } \mu\text{L água ultrapura}$$

### RT-PCR NSP2/RVB

– *Primer NSP2-1F forward*

Concentração: 16,75 nmol

Data de fabricação: Maio 2012

$$16,75 \times 1000 = 16750 \text{ pmol}$$

$$16750 / 200 = 83,75 \text{ } \mu\text{L água ultrapura}$$

– *Primer NSP2-1R reverse*

Concentração: 18,04 nmol

Data de fabricação: Maio 2012

$$18,04 \times 1000 = 18040 \text{ pmol}$$

$$18040 / 200 = 90,2 \text{ } \mu\text{L água ultrapura}$$

– *Primer NSP2-2F forward*

Concentração: 18,7 nmol

Data de fabricação: Jul. 2012

$$18,7 \times 1000 = 18700 \text{ pmol}$$

$$18700 / 200 = 93,5 \text{ } \mu\text{L água ultrapura}$$

– *Primer NSP2-2R reverse*

Concentração: 17,31 nmol

Data de fabricação: Jul. 2012

$$17,31 \times 1000 = 17310 \text{ pmol}$$

$$17310 / 200 = 86,55 \text{ } \mu\text{L} \text{ } \text{água ultrapura}$$

### RT-PCR VP6/RVH

– *Primer VP6/RVN-1F forward*

Concentração: 15,88 nmol

Data de fabricação: Dez. 2012

$$15,88 \times 1000 = 15880 \text{ pmol}$$

$$15880 / 200 = 79,4 \text{ } \mu\text{L} \text{ } \text{água ultrapura}$$

– *Primer VP6/RVN-1R reverse*

Concentração: 18,94 nmol

Data de fabricação: Dez. 2012

$$18,94 \times 1000 = 18940 \text{ pmol}$$

$$18940 / 200 = 94,7 \text{ } \mu\text{L} \text{ } \text{água ultrapura}$$

– *Primer VP6/RVN-2F forward*

Concentração: 16,32 nmol

Data de fabricação: Dez. 2012

$$16,32 \times 1000 = 16320 \text{ pmol}$$

$$16320 / 200 = 81,6 \text{ } \mu\text{L} \text{ } \text{água ultrapura}$$

– *Primer VP6/RVN-2R reverse*

Concentração: 18,54 nmol

Data de fabricação: Dez. 2012

$$18,54 \times 1000 = 18540 \text{ pmol}$$

$$18540 / 200 = 92,7 \text{ } \mu\text{L} \text{ } \text{água ultrapura}$$

Solução estoque: ressuspender em água ultrapura para obtenção de solução 10 x [ ]

Solução de uso de todos os primers: diluir 1:10 a solução estoque em água ultrapura.

Concentração final: 20 pmol/ $\mu\text{L}$

## ANEXO C

Protocolo de Técnicas

---

**• Suspensão fecal - Extração bruta**

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

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

1. Aliquotar 500 µL da suspensão fecal
2. Adicionar 50 µL de SDS 10 %
3. Homogeneizar em vórtex
4. Banho-maria 56 °C / 20 min
5. Centrifugar 10.000 x g / 30 s
6. Adicionar 500 µL de fenol/clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1)
7. Homogeneizar em vórtex
8. Banho-maria 56 °C / 15 min
9. Homogeneizar em vórtex
10. Centrifugar 10.000 x g / 10 min
11. Recolher o sobrenadante em outro microtubo
12. Adicionar 500 µL da solução L6
13. Adicionar 25 µL de sílica hidratada
14. Homogeneizar em vórtex
15. Agitar em temperatura ambiente / 30 min
16. Centrifugar 10.000 x g / 30 s
17. Desprezar o sobrenadante em solução contendo NaOH 10 M
18. Adicionar 500 µL de solução L2

19. Homogeneizar em vórtex
20. Centrifugar 10.000 x g / 30 s
21. Desprezar o sobrenadante em solução contendo NaOH 10M
22. Adicionar 500 µL de solução L2
23. Homogeneizar em vórtex
24. Centrifugar 10.000 x g / 30 s
25. Desprezar o sobrenadante em solução contendo NaOH 10M
26. Adicionar 500 µL de etanol 70% gelado
27. Homogeneizar em vórtex
28. Centrifugar 10.000 x g / 30 s
29. Desprezar sobrenadante em descarte comum
30. Adicionar 500 µL de etanol 70% gelado
31. Homogeneizar em vórtex
32. Centrifugar 10.000 x g / 30 s
33. Desprezar sobrenadante em descarte comum
34. Adicionar 1000 µL de acetona P.A. gelada
35. Homogeneizar em vórtex
36. Centrifugar 10.000 x g / 30 s
37. Desprezar sobrenadante em descarte comum
38. Secar o *pellet* em termo bloco à 60°C (aproximadamente 2 min) ou banho-maria à 56°C (15 min)
39. Adicionar 50 µL de água DEPC
40. Homogeneizar em vórtex
41. Banho-maria 56°C / 15 min
42. Homogeneizar em vórtex
43. Centrifugar 13.000 x g / 4 min
44. Recolher o sobrenadante em microtubo de 500 µL
45. Estocar à 4°C ou -20°C até a utilização

- **SN-PCR para NSP2/RVB – primers Gouvea et al. (1991)**

- **Mix desnaturação**

Mix Desnaturação:
- <i>Primer</i> B1(20 pmol) - 1 $\mu$ L - <i>Primer</i> B4 (20 pmol) - 1 $\mu$ L - Água DEPC -3 $\mu$ L
Volume final - 5 $\mu$ L

- **Mix transcrição reversa (RT-MIX)**

Mix RT-PCR:
- Tampão 10 x pH 8,4 - 2,5 $\mu$ L - MgCl <sub>2</sub> 50 mM - 2,5 $\mu$ L - dNTP 2,5 mM - 4 $\mu$ L - <i>SuperScript II</i> ® 200U/ $\mu$ L - 0,15 $\mu$ L - Água DEPC - 5,85 $\mu$ L
Volume final -15 $\mu$ L

- **Mix da reação em cadeia pela polimerase (PCR-MIX)**

Mix PCR:
- Tampão 10 x pH 8,4 - 2,5 $\mu$ L - dNTP 2,5 mM - 4 $\mu$ L - <i>Platinum</i> ® <i>TaqDNA Polymerase</i> 5U/ $\mu$ L - 0,25 $\mu$ L - Água DEPC - 18,25 $\mu$ L
Volume final - 25 $\mu$ L

**- Mix desnaturação da Semi-Nested**

Mix Desnaturação SN-PCR:
- <i>Primer</i> B1(20 pmol) - 1 $\mu$ L - <i>Primer</i> B3 (20 pmol) -1 $\mu$ L - Água DEPC -3 $\mu$ L
Volume final - 5 $\mu$ L

**- Mix da reação Semi-Nested PCR (SN-PCR MIX)**

Mix SN-PCR:
- Tampão 10 x pH 8,4 - 2,5 $\mu$ L - MgCl <sub>2</sub> 50 mM - 2 $\mu$ L - dNTP 2,5 mM - 4 $\mu$ L - <i>Platinum®TaqDNA Polymerase</i> 5U/ $\mu$ L - 0,25 $\mu$ L - Água DEPC – 11,25 $\mu$ L
Volume final - 20 $\mu$ L

- **RT-PCR para NSP2/RVB e VP6/RVH – primers Suzuki *et al.* (2012) e Molinari *et al.* (2014)**

**- Mix desnaturação**

Mix Desnaturação NSP2/RVB:
- <i>Primer</i> NSP2-F (20 pmol) - 1 $\mu$ L - <i>Primer</i> NSP2-R (20 pmol) - 1 $\mu$ L - Água DEPC - 5 $\mu$ L
Volume final - 7 $\mu$ L

Mix Desnaturação VP6/RVH:
- <i>Primer</i> VP6-F (20 pmol) - 1 $\mu$ L - <i>Primer</i> VP6-R (20 pmol) - 1 $\mu$ L - Água DEPC - 5 $\mu$ L
Volume final - 7 $\mu$ L

**- Mix transcrição reversa (RT-MIX)**

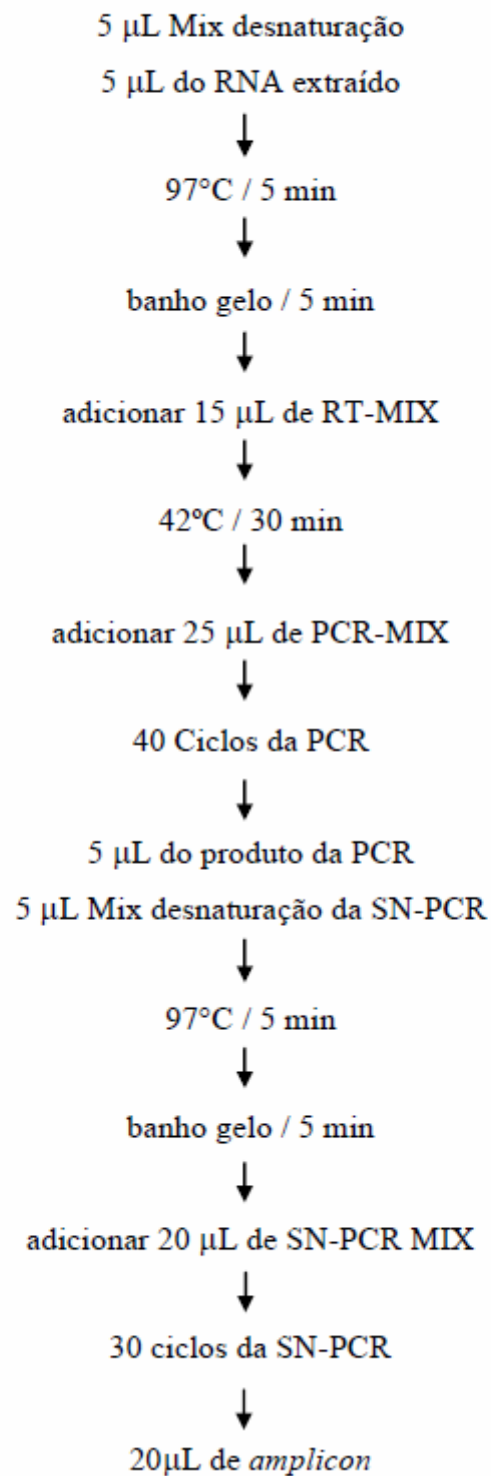
Mix RT-PCR:
- Tampão 5 x pH 8,4 - 4 $\mu$ L - DTT 1mM- 2 $\mu$ L - dNTP 2,5 mM - 1 $\mu$ L - <i>SuperScript II</i> ® 200U/ $\mu$ L - 0,5 $\mu$ L - Água DEPC - 0,5 $\mu$ L
Volume final - 8 $\mu$ L

**- Mix da reação em cadeia pela polimerase (PCR-MIX)**

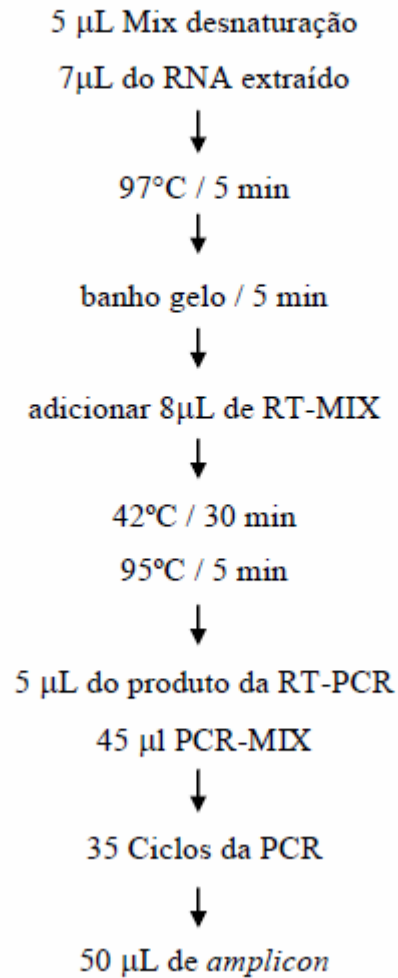
Mix PCR NSP2/RVB:
- Tampão 10 x pH 8,4 - 5 $\mu$ L - MgCl <sub>2</sub> 50 mM - 1,5 $\mu$ L - dNTP 2,5 mM-2 $\mu$ L - <i>Primer</i> NSP2-F - 1 $\mu$ L - <i>Primer</i> NSP2-R - 1 $\mu$ L - <i>Platinum</i> ® <i>TaqDNA Polymerase</i> 5U/ $\mu$ L - 0,5 $\mu$ L - Água DEPC - 34 $\mu$ L
Volume final - 45 $\mu$ L

**- Mix da reação em cadeia pela polimerase (PCR-MIX)**

Mix PCR VP6/RVH:
- Tampão 10 x pH 8,4 - 5 $\mu$ L - MgCl <sub>2</sub> 50 mM – 1,5 $\mu$ L - dNTP 2,5 mM – 2 $\mu$ L - <i>Primer</i> VP6-F - 1 $\mu$ L - <i>Primer</i> VP6-R – 1 $\mu$ L - <i>Platinum®TaqDNA Polymerase</i> 5U/ $\mu$ L - 0,5 $\mu$ L - Água DEPC - 34 $\mu$ L
Volume final - 45 $\mu$ L

**Esquema da SN-PCR NSP2/RVB – Gouvea *et al.* (1991)**

**Esquema da RT-PCR NSP2/RVB e VP6/RVH –  
Suzuki *et al.* (2012) e Molinari *et al.* (2014)**



Ciclos da PCR		
Ciclos	NSP2/RVB – Gouvea <i>et al.</i> (1991)	NSP2/RVB – Suzuki <i>et al.</i> (2012); VP6/RVH – Molinari <i>et al.</i> (2014)
Desnaturação inicial	94°C / 3 min	94°C / 3 min
Desnaturação Anelamento Extensão Nº de ciclos térmicos	94°C / 45 s 45°C / 45 s 72°C / 1 min 40	94°C / 1 min 48°C / 1 min 72°C / 1 min 35
Extensão final	72°C / 10 min	72°C / 10 min

<b>Ciclos da SN-PCR</b>	
Ciclos	NSP2/RVB – Gouvea <i>et al.</i> (1991)
Desnaturação inicial	94°C / 3 min
Desnaturação Anelamento Extensão Nº de ciclos térmicos	94°C / 30 s 42°C / 30 s 72°C / 45 min 30
Extensão final	72°C / 7 min

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

1. 1 g de agarose
2. 50 mL TEB *buffer* (Tris 89mM; ácido bórico 89 mM; EDTA 2mM) pH 8,4
3. 30 µL de brometo de etídeo (0,5 µg/mL)

São utilizados 8 µL do *amplicon* e 2 µL do tampão de amostra, onde a eletroforese sob voltagem (100 V) 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 3 µL do *Gel Solubilization Buffer* (L3) (*Invitrogen™ Life Technologies, EUA*) para cada 1 mg de gel
2. Incubar o tubo a 50°C / 15 min, homogeneizando a cada 3 min
3. Centrifugar a 12.000 x *g* / 30 s
4. Transferir amostra solubilizada para um tubo coletor com coluna
5. Centrifugar a 12.000 x *g* / 1 min
6. Descartar o filtrado e recolocar a coluna no mesmo tubo
7. Adicionar 500 µL do *Wash buffer* (W1) na coluna com tubo coletor
8. Centrifugar a 12.000 x *g* / 1 min
9. Descartar o filtrado e recolocar a coluna no mesmo tubo
10. Centrifugar a 12.000 x *g* / 1-2 min
11. Descartar o filtrado e transferir a coluna para um microtubo de 1,5 mL
12. Adicionar 30 µL do *Elution buffer* (E5)

13. Incubar a temperatura ambiente por 1 min
  14. Centrifugar a 12.000 x g / 1 min
  15. Proceder com a etapa de quantificação ou estocar o fragmento de DNA purificado a -20°C
- **Quantificação de produto de PCR**
    1. Preparar a solução *Quant-iT<sup>TM</sup> Working Solution* diluindo o reagente *Quant-iT<sup>TM</sup>* no *Buffer Quant-iT<sup>TM</sup>*, 1:200 (*Invitrogen<sup>TM</sup> Life Technologies, EUA*). São necessários 200 µL desta solução por amostra e para os padrões 0 e 100
    2. Homogeneizar em vórtex
    3. No microtubo das amostras adicionar 198 µL da solução *Quant-iT<sup>TM</sup> Working Solution* a 2 µL do DNA purificado
    4. No microtubo do padrão 0 adicionar 190 µL da solução *Quant-iT<sup>TM</sup> Working Solution* a 10 µL do padrão 0
    5. No microtubo do padrão 100 adicionar 190 µL da solução *Quant-iT<sup>TM</sup> Working Solution* a 10 µL do padrão 100
    6. Homogeneizar os microtubos em vórtex por 2-3 s
    7. Incubar os microtubos em temperatura ambiente por 2 min
    8. Realizar a leitura usando *Qubit<sup>TM</sup> fluorometer* (*Invitrogen<sup>TM</sup> Life Technologies, EUA*)
    9. Multiplicar pelo fator de diluição para determinar a concentração correta da amostra

## ANEXO D

Lista de Softwares

---

- *Electropherogram quality analysis - Phred e CAP3*

(<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>)

- *BLAST The Basic Local Alignment Search Tool*

(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

- *MEGA package software version 6.05*

(<http://www.megasoftware.net/mega5/mega5.html>)

- *BioEdit software version 7.1.3.0*

(<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>)