



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

KERLEI CRISTINA MÉDICI

**ROTAVÍRUS GRUPOS A, B E C EM LEITÕES LACTENTES:
FREQUÊNCIA DE DIAGNÓSTICO E AVALIAÇÃO MOLECULAR DE
ROTAVÍRUS ATÍPICOS**

Londrina
2007

KERLEI CRISTINA MÉDICI

**ROTAVÍRUS GRUPOS A, B E C EM LEITÕES LACTENTES:
FREQUÊNCIA DE DIAGNÓSTICO E AVALIAÇÃO MOLECULAR DE
ROTAVÍRUS ATÍPICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Amauri Alcindo Alfieri

Londrina
2007

KERLEI CRISTINA MÉDICI

**ROTAVÍRUS GRUPOS A, B E C EM LEITÕES LACTENTES:
FREQUÊNCIA DE DIAGNÓSTICO E AVALIAÇÃO MOLECULAR DE
ROTAVÍRUS ATÍPICOS**

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marco Antônio Bacellar Barreiros
Universidade do Vale do Itajaí / SC

Prof. Dr. Marcelo Marcondes Seneda
Universidade Estadual de Londrina

Prof. Dr. João Luis Garcia
Universidade Estadual de Londrina

Dra. Elisabete Takiuchi
SEAB/PR

Prof. Dr. Amauri Alcindo Alfieri
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 25 de Setembro de 2007.

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 Doutor 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 de fomento à pesquisa abaixo relacionadas:

- 1.CNPq: Conselho Nacional do 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**
- 4.FINEP: Financiadora de Estudos e Projetos / MCT**

DEDICATÓRIA

Á minha maravilhosa família, fonte de amor,
caráter, carinho e apoio em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

À Deus, inesgotável fonte de paciência, sabedoria e amor...

Ao Prof. Dr. Amauri A. Alfieri pelo exemplo de profissionalismo e dedicação, compartilhando experiências e conhecimento durante a realização deste trabalho. Meu agradecimento pela orientação, paciência e colaboração que foram muito significativos para a conclusão desta etapa.

À Profa. Dra. Alice Fernandes Alfieri pela confiança e conselhos durante todos esses anos.

Aos membros da Comissão Examinadora na banca de qualificação: Profa. Dra. Alice Fernandes Alfieri, Dra. Elisabete Takiuchi, Dra. Flora Satiko Kano pelas valiosas contribuições.

Agradecimentos especiais a Aline Barry pelo auxílio nos trabalhos de análise filogenética; Elisabete Takiuchi pela “art-final”; Flora Satiko Kano pela aula de análise filogenética. A todas vocês, muito obrigado pela disponibilidade e acessibilidade sempre presentes para compartilhar informações e experiências.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal pela formação acadêmica científica.

À todos os funcionários da Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-graduação (PROPPG).

À todos os funcionários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, especialmente a Luciene G. Preto e Elizabete R. M. Marrangoni pelo companheirismo e por cada risada e cada lágrima derramada ao longo destes anos.

Ao Prof. Antonio Carlos F. Reis e Profa. Célia Guadalupe pela paciência e amizade, confiança e auxílio em todos os momentos, principalmente nos mais difíceis, me fazendo prosseguir.

À Daliria do Prado e Maria Yoshikawa pelo auxílio na realização desta tese mas principalmente pela amizade e carinho que permanecem ao longo de todos esses anos.

Aos secretários Valdecir, Reinaldo e Helenice pela paciência e trâmites burocráticos.

Ao meu pai Evandro Médici (que falta você faz), minha mãe (Tarcilia), irmãos (Carlos, José, Cássio, Rita, Vera, Marcos) cunhadas (Regiane, Leonice, Jorge, Paulo, Dani) e sobrinhos (Rodrigo, Fernanda, Livia, Bruna, Camila, Carol, Paulinha, Lucas) que são minha base, meu exemplo e fonte de vida. Obrigada por tudo. Perdão por tudo.

Ao meu marido José Cláudio Cristiano (“Oscar”) que é meu companheiro, amigo, conselheiro, dono de uma bondade que somente as pessoas mais evoluídas possuem.

A minha amiga-irmã Karen Cristina Aborhian que está comigo sempre.....

A Elisabete Takiuchi, Flora Satiko Kano, Juliana Dias, Walfrido Svoboda pela amizade de muitos anos. Mesmo que a distância e o tempo nos separem vocês estarão sempre no meu coração.

Ao “amigasso” Kledir pelas risadas, conselhos e broncas (e que broncas...) sempre me fazendo enxergar a realidade das coisas e pela amizade sempre constante. Amigo não é aquele que passa a mão na tua cabeça...

Aos queridos amigos Bruna, Daniel (Frango), Alexandre, Fran, Luciano Malanski, Marlise, Michele, Daniela Dibs, Aline, Danilo, Noemi, Fernanda, Livia, Marina, Elis, Danilo (Jr.), Rose pela amizade e auxílio direta ou indiretamente na realização deste trabalho.

Ao animais, motivo principal da minha profissão, muitas vezes esquecidos e desrespeitados pela ganância e insensibilidade do homem.

E a todos que estiveram presentes em algum momento na minha vida. Tenham certeza, que hoje, eu sou reflexo de tudo o que vivi e vivo, e cada um de vocês (pessoas boas e outras nem tanto) a sua maneira (certa ou não - quem sou eu para saber isso), contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional.

MÉDICI, K.C. **Rotavírus grupos A, B e C em leitões lactentes: Frequência de diagnóstico e avaliação molecular de rotavírus atípicos.** 2007. 97f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2007.

RESUMO

O Rotavírus é um dos principais agentes etiológicos das diarreias em leitões lactentes em todo o mundo. Devido à facilidade na identificação, com frequência, apenas o grupo A de rotavírus é incluído nos estudos epidemiológicos da rotavirose em leitões. O objetivo desse estudo foi avaliar a frequência de diagnóstico de rotavírus grupos A, B e C em episódios de diarreia em leitões lactentes e realizar análises filogenéticas em estirpes de rotavírus grupos B e C identificadas no Brasil. Para a definição da amostragem foi utilizado como critério de inclusão o resultado prévio obtido pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE), tendo sido selecionadas 144 amostras fecais que apresentaram resultados inconclusivos em PAGE. A identificação dos grupos A, B e C foi realizada por meio de técnicas de RT-PCR. Para o grupo A foram utilizados *primers* consensuais para G (VP7) e P (VP4) tipos. O diagnóstico do grupo B foi realizado por meio de semi nested-PCR que amplifica um fragmento com 434 pb do gene 8 (NSP2). O grupo C foi identificado por meio da amplificação por RT-PCR de um produto com 270 pb do gene 5 (VP6). Das 144 amostras analisadas apenas 41 (28,5%) foram negativas, simultaneamente, para os três grupos de rotavírus. Infecções singulares foram identificadas em 58 (40,3%) amostras sendo que em 34 (23,6%) amostras foi identificado o grupo A, em 19 (13,2%) o grupo B e em 5 (3,5%) amostras o grupo C. Em 45 (31,2%) amostras prevaleceram as infecções mistas com dois e até mesmo os três grupos de rotavírus. Rotavírus dos grupos B e C foram identificados com maior frequência (42,4%) em infecções mistas. Onze produtos amplificados a partir de amostras positivas para o rotavírus grupo C e três para o grupo B foram seqüenciados em ambos os sentidos. Com relação ao grupo C, nove seqüências puderam ser analisadas. A identidade de nucleotídeos entre elas variou de 81,3% a 94,3%. Três produtos apresentaram identidade próxima (91,3%-93,9%) ao protótipo Cowden de origem suína. As outras seis amostras formaram um novo ramo, distinto daqueles formados pelas estirpes de origem suína, bovina e humana disponíveis em bases públicas de dados. Os três produtos, amplificados a partir de amostras fecais de leitões positivas para o rotavírus grupo B, apresentaram entre si identidade de 90,1% a 91,8% e formaram um ramo distinto daqueles formados pelas estirpes de origem humana e de rato, evidenciando que as estirpes puderam ser diferenciadas de acordo com o seu hospedeiro de origem. As taxas de diagnóstico positivo identificadas nesse trabalho ratificam a importância da rotavirose nos episódios de diarreia em leitões lactentes no Brasil. A expressiva frequência de diagnóstico dos grupos B e C, tanto em infecções singulares quanto mistas, sugere que a taxa de infecção de leitões por esses vírus esta sendo subestimada. As análises moleculares demonstraram a heterogeneidade das estirpes brasileiras de rotavírus suíno grupo C no Brasil. Foi possível ainda a caracterização de um novo *cluster* de rotavírus grupo B, ainda não descrito na literatura, composto pelas amostras brasileiras de origem suína, e que possibilitou diferenciar as estirpes de origem humana e de rato disponíveis em bases públicas de dados com aquelas de origem suína.

Palavras chave: Suínos. Diarreia. Rotavírus grupo A. Rotavírus atípicos. RT-PCR. Filogenia.

MÉDICI, K.C. **Groups A, B, and C rotavirus in suckling piglets: Diagnosis frequency and molecular evaluation of atypical rotaviruses.** 2007. 97p. Thesis (Doctorate Degree in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

ABSTRACT

Rotavirus is one of the main etiological agents causing diarrhea in suckling piglets worldwide. Due to the more easy in the identification, frequently only group A rotaviruses are included in epidemiological studies of piglets diarrhea. The aim of this study was to evaluate the diagnosis frequency of groups A, B, and C rotaviruses in diarrheic suckling piglets and carry out phylogenetic analyses in groups B and C rotavirus strains identified in Brazil. For the definition of the sampling it was used as inclusion criterion the previous result obtained by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), having been selected 144 stool samples that presented inconclusive results by PAGE. The identification of groups A, B, and C rotaviruses was carried out by RT-PCR assays. To identify group A rotavirus were used consensus primers for G (VP7) and P (VP4) types. The group B rotavirus was identified by a semi-nested PCR assay that amplified a 434 bp fragment from gene 8 (NSP2). For the gene 5 (VP6) group C rotavirus detection was used a RT-PCR assay that amplified a 270 bp amplicon. In 144 stool samples analyzed, only 41 (28.5%) were simultaneously negatives for the tree rotavirus groups. Single infection were detected in 58 (40.3%) samples, where in 34 (23.6%) samples were identified the group A; in 19 (13.2%) samples the group B, and in 5 (3.5%) samples the group C rotavirus. In 45 (31.4%) stool samples were identified mixed infections with two and even three rotavirus groups. Groups B and C rotavirus were more frequent (42.4%) in mixed infection. Eleven amplicons from positive stool samples for group C rotavirus and three for group B were sequencing in both direction. Related to the group C, nine sequences could be analyzed. The nucleotide identity among them varied from 81.3% to 94.3%. Three products showed close (91.3%-93.9%) identity to Cowden strain from porcine origin. The other six samples formed a new cluster separated that other porcine, bovine, and human strains available in public data base. Three amplicons from positive fecal samples for group B rotavirus presented identity from 90.1 to 91.8% and formed a distinct cluster from those formed by the strains of human and rat origin evidencing that the strains could be differentiated in agreement with your host origin. The rate of positive diagnosis identified in this study showed the importance of the rotaviruses in diarrheic suckling piglets in Brazil. The higher frequency of groups B and C diagnosis, as in single or mixed infections, suggest that the rate of piglet infections for those viruses this being underestimated. The molecular analysis showed heterogeneity of porcine group C rotavirus strains in Brazil. It was still possible the characterization of a new cluster of group B rotavirus, not yet described in the literature, composed by the Brazilian strains of porcine origin, and that allowed to differentiate the strains of human and rat origin available in public data base with those of porcine origin.

Keywords: Porcine. Diarrhea. Group A rotavirus. Atypical rotavirus. RT-PCR. Phylogeny.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1 – Perfis eletroforéticos do genoma viral (dsRNA) do rotavírus..... 21

EVIDENCE OF VP6 GENE DIVERSITY IN BRAZILIAN STRAINS OF PORCINE GROUP C ROTAVIRUS

Figura 1 – Phylogenetic tree reconstructed by neighbor-joining method (Kimura 2-parameter) and 1000 replicates among human, porcine, bovine and Brazilian strains of GCR based on partial (230 nt) VP6 gene. Sequences used in the alignment were acquired from GenBank as follows accession numbers: Bristol (X59843), Moduganari (AF325806), Belém (M94155), WD534tc (AF162434), Cowden (M94157), BRA22-UEL (EU002779), BRA21-UEL (EU002778), BRA29-UEL (EU002785), BRA23-UEL (EU002780), BRA26-UEL (EU002782), BRA25-UEL (EU002781), BRA30-UEL (EU002786), BRA27-UEL (EU002783), BRA28-UEL (EU002784), Shintoku (M 88768) and Yamagata (AB 108680) 66

PHYLOGENETIC ANALYSIS OF PORCINE GROUP B ROTAVIRUS NSP2 GENE

Figura 1 – Dendrogram reconstruction among human [CAL-1 (AY238383), CAL-6 (AY941792), CAL-8 (AY864913), CAL-10 (AY864914), CAL-14 (AY941778), CAL-16 (AY941789), CAL-17 (AY941776), CAL-28 (AY941777), CAL-30 (AY941790), CAL-34 (AY941791), CAL-41 (AY941779), Bang373 (AY238393), ADRV (AJ867609), WH1 (AY212934)], rat [IDIR (U03558)], and Brazilian [BRA12-UEL, BRA14-UEL and BRA16-UEL] group B rotaviruses strains, based on partial (356 nt) NSP2 gene. Group A rotavirus strains were SA11 (DQ838615) and KU (AB022770), from human, and KJ75 (DQ494402) from bovine. The Bristol (AJ132205) strain (group C rotavirus) was from a humaninfection... 73

LISTA DE TABELAS E QUADROS

REVISÃO DE LITERATURA

- Quadro 1** – Organização genômica e protéica dos rotavírus..... 18
- Quadro 2** – Freqüência de diagnóstico de rotavírus grupos B e C em leitões com idade inferior a quatro semanas de idade, de acordo com o local de origem das amostras estudadas 25

INFECÇÕES SINGULARES E MISTAS POR ROTAVÍRUS GRUPOS A, B E C IDENTIFICADAS POR RT-PCR EM FEZES DIARRÉICAS DE LEITÕES LACTENTES

- Quadro 1** – Oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados para a detecção de rotavírus grupos A, B e C em fezes de leitões..... 48
- Tabela 1** – Distribuição dos resultados do diagnóstico de rotavírus grupos A, B e C em amostras de fezes de leitões, de acordo com a técnica e a amostragem utilizada 49
- Tabela 2** – Distribuição dos resultados do diagnóstico de rotavírus grupos A, B e C em fezes diarréicas de leitões por RT-PCR, de acordo com o tipo de infecção..... 49
- Tabela 3** – Distribuição do diagnóstico de rotavírus grupos A, B e C em infecções singulares e mistas identificados por RT-PCR em fezes diarréicas de leitões lactentes ($n=144$), de acordo com a faixa etária dos animais..... 49
- Tabela 4** – Distribuição dos resultados da RT-PCR com *primers* consensuais para a detecção dos genes VP4 (P tipo) e VP7 (G tipo) do rotavírus grupo A em fezes ($n=144$) de leitões com diarreia..... 50

EVIDENCE OF VP6 GENE DIVERSITY IN BRAZILIAN STRAINS OF PORCINE GROUP C ROTAVIRUS

- Tabela 1** – Strains with available VP6 gene sequence in the study and original host..... 65

Tabela 2 – Identity matrix of partial gene 5 (VP6) sequence among Brazilian, porcine, bovine and human GCR strains. Nucleotide (230 nt) is showed in the upper half of the matrix and amino acid (76 aa) in the lower half 66

PHYLOGENETIC ANALYSIS OF PORCINE GROUP B ROTAVIRUS NSP2 GENE

Tabela 1 – Nucleotide identity matrix (356 nt) of partial NSP2 gene, among Brazilian and published strains of group A, B and C rotavirus 73

LISTA DE ABREVIACÕES, SIGLAS E SÍMBOLOS

aa – aminoácido

bd – bidestilada

ds – duplo segmento

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

ELISA – Ensaio Imunoenzimático (*enzyme-linked immunosorbent assay*)

gp – grupo

IF – Imunofluorescência

LA – Látex-aglutinação

MA-104 – células renais de macaco *Rhesus*

ME – Microscopia eletrônica

μL – micro-litros (10^{-3} mL)

mM – milimolar (10^{-3} molar)

n – número total de amostras

nm – nanômetro

NSP – proteína não-estrutural (*non-structural protein*)

PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida

PBS – tampão salina-fosfato

PCR – Reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction*)

pH – potencial hidrogeniônico

q.s.p. – quantidade suficiente para

RNA – ácido ribonucleico

RNAfd – ácido ribonucleico fita dupla

RT-PCR – Reação da transcrição reversa (*reverse-transcription*)

RV – rotavírus

VP – proteína viral (*viral protein*)

SDS – dodecil sulfato de sódio

SN – semi-nested PCR

TBE – tampão Tris-borato-EDTA

TRIS – hidroximetil aminometano

μL – Microlitro (10^{-6} litro)

μM – Micromolar (10^{-6} Molar)

μg – Micrograma (10^{-6} grama)

SUMÁRIO

1 REVISÃO DE LITERATURA	15
Introdução.....	15
Rotavírus.....	16
Diagnóstico.....	20
Rotavirose suína.....	23
Referências.....	27
2 OBJETIVOS	37
2.1 OBJETIVO GERAL.....	37
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
3 ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO	38
3.1 INFECÇÕES SINGULARES E MISTAS POR ROTAVÍRUS GRUPOS A, B E C IDENTIFICADAS POR RT-PCR EM FEZES DIARRÉICAS DE LEITÕES LACTENTES.....	38
Resumo.....	38
Abstract.....	40
Introdução.....	41
Material e Métodos.....	42
Amostras fecais e critério de inclusão.....	42
Extração do RNA.....	42
Deteccção de rotavírus grupos A, B e C.....	43
Análise dos produtos amplificados.....	43
Seqüenciamento.....	44
Análise Estatística.....	44
Resultado e Discussão.....	44
Referências.....	51
3.2 EVIDENCE OF VP6 GENE DIVERSITY IN BRAZILIAN STRAINS OF PORCINE GROUP C ROTAVIRUS.....	55
Abstract.....	55
Introduction.....	56
Materials and Methods.....	57
Stool samples.....	57

Detection of porcine group C rotavirus by RT-PCR.....	58
Purification and sequence analysis.....	58
Results.....	59
Discussion.....	60
References.....	62
3.3 PHYLOGENETIC ANALYSIS OF PORCINE GROUP B ROTAVIRUS NSP2 GENE.....	67
Abstract.....	67
References.....	71
4 CONCLUSÕES.....	74
APÊNDICES.....	75
APÊNDICE 1 – Lista de reagentes.....	76
APÊNDICE 2 – Lista de soluções e tampões.....	79
APÊNDICE 3 – Protocolo de técnicas.....	87
ANEXOS.....	95
ANEXO 1.....	96

1 REVISÃO DE LITERATURA

Introdução

As infecções entéricas ocasionam prejuízos econômicos consideráveis à suinocultura. As diarreias neonatais representam um importante problema sanitário que compromete os rebanhos suínos independentemente do nível de tecnificação da criação. Os prejuízos econômicos determinados pelas diarreias podem comprometer a longevidade da exploração econômica de suínos devido ao aumento nas taxas de morbidade e mortalidade do rebanho (PAUL; LYOO, 1993).

Os episódios de diarreia em animais jovens determinam ainda alterações consideráveis nas taxas de conversão alimentar e de ganho de peso, ocasionando problemas de manejo em consequência da desuniformidade dos lotes. As despesas adicionais com mão de obra e o tratamento dos animais doentes contribuem também com o aumento nos custos da produção. A desidratação, o desequilíbrio eletrolítico e a acidose são os sinais clínicos mais freqüentes. Os animais doentes apresentam queda de resistência e maior predisposição a outras infecções, principalmente as respiratórias (PAUL; LYOO, 1993; CALDERARO et al., 2001; WIELER et al., 2001).

Em leitões, as diarreias ocorrem tanto em animais lactentes quanto em recém-desmamados. As fases de maternidade e creche representam o período de maior desafio à sanidade entérica dos leitões. A imaturidade imunológica e a falha na proteção passiva são as principais causas da maior susceptibilidade dos animais na maternidade. No período pós-desmame, a primeira e a segunda semanas constituem fatores de risco para as diarreias, principalmente devido às alterações de ordem social e alimentar a que os animais são expostos em decorrência do manejo (SPENCER et al., 1989; KATOULI et al., 1995; MELIN et al., 2000).

A etiologia das diarreias é bastante complexa e fatores ambientais, nutricionais e vários agentes infecciosos como vírus, bactérias, parasitas e toxinas bacterianas podem estar envolvidos nesta síndrome. A importância relativa dos agentes etiológicos é variável e o predomínio de um determinado agente em rebanhos, regiões ou mesmo a sua distribuição sazonal, está relacionada com a intensidade e a regularidade com que medidas de caráter higiênico-sanitário são adotadas (JANKE, 1989; CICIPRELLO; GLASS, 1994).

As causas infecciosas mais comuns das diarreias em suínos nos períodos do pré e do pós-desmame no Brasil são representadas pelos enteropatógenos *Escherichia coli*, rotavírus, calicivirus, *Isospora suis*, *Cryptosporidium* sp. e *Clostridium perfringens*. Estes agentes causam diarreia cuja intensidade pode variar desde branda a grave, podendo culminar com a morte dos animais comprometidos. As variações nos sinais clínicos e nas taxas de morbidade e de mortalidade são devidas às diferenças na virulência e/ou na dose infecciosa do patógeno; a associação entre microrganismos; aos aspectos relacionados ao hospedeiro como o *status* imunológico e a idade; e a fatores relacionados ao meio ambiente e ao manejo como limpeza, desinfecção, umidade e ventilação, entre outros (MELIN et al., 2004). A semelhança dos sinais clínicos, independentemente do agente etiológico, impossibilita a determinação da etiologia com base apenas nos parâmetros clínicos (DRIESEN et al., 1993).

Com relação à etiologia viral das diarreias, os rotavírus (RV) são considerados a principal causa de infecções entéricas em mamíferos e em espécies aviárias jovens em todo o mundo. A gama de hospedeiros é extensa e além de seres humanos inclui várias espécies de animais de produção, destacando-se, principalmente, pelo impacto econômico que representa ao setor produtivo, as infecções em leitões, bezerros e em aves jovens como frangos de corte e perús (McNULTY, 1978; ESTES et al., 1981; HO et al., 1988; ESTES; COHEN, 1989).

Rotavírus

Rotavírus são membros da família *Reoviridae* e pertencem ao gênero *Rotavirus*. A partícula viral é de simetria icosaédrica, com aproximadamente 70 a 90 nm de diâmetro, não apresenta envelope lipoprotéico e o capsídeo é constituído por três camadas concêntricas de proteínas (ESTES; COHEN, 1989). O genoma viral é formado por 11 segmentos de RNA fita dupla (dsRNA) (PRASHAD; CHIU, 1994). Cada segmento genômico é monocistrônico, com exceção dos segmentos 7, 8 ou 9 que, dependendo da estirpe viral, codificam uma proteína do capsídeo externo (VP7). O genoma segmentado completo dos RV apresenta 18.550 pares de base (pb), e os tamanhos dos segmentos genômicos variam entre 663 e 3302 pb (ESTES; COHEN, 1989; ESTES, 2001).

Cada segmento de RNA codifica um polipeptídeo viral específico (KAPIKIAN; CHANOK, 1996; HOSHIMO et al., 2005) e é numerado de acordo com a

ordem de migração em eletroforese em gel de poliacrilamida (*polyacrylamide gel electrophoresis* - PAGE). O primeiro segmento, com maior massa molecular, e o segmento 11, com menor massa molecular, correspondem aos segmentos de menor e de maior taxa de migração em PAGE, respectivamente (PEDLEY et al., 1983).

O genoma dos RV codifica seis proteínas estruturais (VP – *viral protein*) e seis proteínas não-estruturais (NSP – *non-structural protein*). As VP (VP1; VP2; VP3; VP4; VP6 e VP7) e as NSP, presentes em partículas virais maduras (NSP1; NSP2; NSP3; NSP4; NSP5; NSP6) são seguidas por números em ordem decrescente da massa molecular (quadro 1). As proteínas VP1, VP2 e VP3 formam a camada interna, ou *core*, do capsídeo viral. A proteína VP6 constitui a camada intermediária, e as proteínas VP4 e VP7 formam a camada externa do capsídeo (ESTES; COHEN, 1989; MIDTHUN; KAPIKIAN, 1996). O quadro 1 apresenta a composição protéica dos RV e a sua localização na partícula viral.

Com base na especificidade antigênica da VP6 os RV são classificados em sete grupos sorológicos (sorogrupos) denominados de A a G. Todos os membros de cada sorogrupo, independentemente da espécie de origem, apresentam seu próprio antígeno comum que é antigenicamente distinto entre os sorogrupos. Tanto em seres humanos quanto em animais o sorogrupo A de RV (RV gp A) é o principal causador de diarreia em indivíduos jovens em todo o mundo. Em seguida, os RV pertencentes aos grupos B e C são os de maior ocorrência mundial (SAIF; THEIL, 1985; BRIDGER, 1987; SAIF, 1990; MACKOW, 2002).

A proteína VP4 exerce influência direta na patogenicidade e na atenuação das estirpes de RV gp A e apresenta epítomos neutralizantes que, juntamente com a VP7, estão associados à neutralização sorotipo-específica e à proteção contra a infecção. Com isso, à semelhança do vírus influenza, os RV apresentam uma classificação sorológica binária onde devem ser consideradas as especificidades antigênicas das proteínas VP4 e VP7, formadoras da camada externa do capsídeo viral (HOSHINO et al., 1985; OFFIT et al., 1986).

Para a padronização da nomenclatura, os sorotipos de RV gpA relacionados a VP4, são denominados sorotipos “P” devido à sua susceptibilidade a clivagem proteolítica. Os sorotipos relacionados ao polipeptídeo VP7, por serem de constituição glicoproteica, são denominados sorotipos “G” (ESTES; COHEN, 1989).

A identificação por métodos sorológicos dos sorotipos G e P de RV gpA apresenta uma série de limitações como: i) alta taxa de amostras não sorotipadas nos levantamentos epidemiológicos; ii) grande número de infecções mistas ou variantes antigênicas; iii) não caracterização de sorotipos P por meio de ensaios imunoenzimáticos comerciais (ALFIERI, 1999). Com isso, a genotipagem passou a ser utilizada como uma

técnica alternativa à sorotipagem dos RV gpA. Atualmente são reconhecidos 15 genótipos G (G1 a G15) e 27 genótipos P (P[1] a P[27]) demonstrando a ampla diversidade antigênica desse grupo de RV (KAPIAKAN et al., 2001; MARTELLA et al., 2006; KHAMRIN et al., 2007).

SEGMENTO GENÔMICO	POLIPEPTÍDEO	MASSA MOLECULAR ^(A) (kDa)	LOCALIZAÇÃO
1	VP1	125	Capsídeo interno
2	VP2	102	Capsídeo interno
3	VP3	83	Capsídeo interno
4	VP4	87	Capsídeo externo
5	NSP1	58	Não-estrutural
6	VP6	45	Capsídeo intermediário
7	NSP3	36	Não-estrutural
8	NSP2	36	Não-estrutural
9	VP7	34	Capsídeo externo
10	NSP4	20	Não-estrutural
11	NSP5	22	Não-estrutural
	NSP6		Não-estrutural

Quadro 1 – Organização genômica e protéica dos rotavírus.

Dados obtidos a partir de genes clonados do protótipo SA11 de RV símio

Os outros dados são relativos ao protótipo RF de RV bovino

(Fonte: PRASAD; CHIU, 1994 [com modificações])

Apesar da caracterização dos rotavírus, particularidades sobre a replicação do genoma viral e as diversas fases que envolvem a morfogênese ainda não foram esclarecidas (ARNOLDI et al., 2007). A proteína NSP2, assim como a proteína NSP5, participam no processo de formação do viroplasma e replicação viral durante infecções naturais (CAMPAGNA et al., 2005; SILVESTRI et al., 2004). Apresenta tamanho relativamente pequeno, quando comparada com outras proteínas, assumindo a forma de um octâmero quando em solução (JIANG et al., 2006). Análises moleculares utilizando a proteína NSP2 como seqüência alvo têm demonstrado resultados satisfatórios na detecção do rotavírus grupo B humano e animal em análises provenientes de amostras fezes (GOUVEIA et al., 1991).

Uma proteína não-estrutural de relevância é a proteína NSP4, devido ao seu envolvimento com a morfogênese viral e sua atividade enterotóxica (MARTELLA et al., 2003). Estudos com a proteína NSP4 do rotavírus grupo A, sugerem sua classificação em

cinco genogrupos: i) genogrupos A, B e C isolados de leporinos, eqüinos, bovinos, suínos, símios, caninos e felinos e seres humanos nos quais análises filogenéticas mostram o agrupamentos das estirpes sempre em um mesmo *cluster*, sugerindo uma evolução constante entre estas estirpes virais; ii) genogrupos D e E encontrados somente em camundongos e aves, respectivamente (CIARLET et al., 2000).

Com relação aos RV grupo B tanto a caracterização antigênica e molecular quanto a prevalência da infecção ainda não estão claramente estabelecidos (TSUNEMITSU et al., 1999), principalmente devido à dificuldade de adaptação desse grupo de RV em culturas celulares (THEIL; SAIF, 1985). Estudos moleculares, direcionados aos genes que codificam as proteínas do capsídeo interno, indicam particularidades nos RV gpB, quando comparados aos RV gpA e RV gpC (CHEN et al., 1991).

A variação genética existente entre as estirpes de RV gpB ainda é pouco caracterizada, porém análises de nucleotídeos e de aminoácidos da proteína VP7, tem demonstrado grande diversidade em estirpes de RV gpB em relação ao RV gpA (45,2% de identidade) e ao RV gpC (26,4% de identidade) (CHANG et al., 1997; CHEN et al., 2002). Análises moleculares demonstraram também grande variabilidade de estirpes do RV gpB, provenientes de diferentes hospedeiros e de diversas regiões do mundo (CHEN et al., 1991; PEDRIC et al., 1991; EIDEN; ALLEN., 1992; CHANG et al., 1997; KANG et al., 2005).

Técnicas de hibridização molecular têm sido utilizadas para avaliar a diversidade genética entre estirpes de RV gpB. O seqüenciamento dos genes 4 (VP4), 6 (NSP1), 8 (NSP2), 9 (VP7) e 11 (NSP5) dos protótipos indianos CAL (Calcutá) e ADRV (*adult diarrhea rotavirus*), e de algumas estirpes virais provenientes de surtos de diarreias em seres humanos, revelaram grande diversidade antigênica nas estirpes de RV gpB (SEN et al., 2001; KELKAR; ZADE, 2004; JIANG et al., 2005; ALAM et al., 2006).

A identificação de segmentos genômicos homólogos, utilizando a técnica de hibridização com *probes*, indicou que as estirpes de RV gpB IDIR (*infant diarrhea rats*) e ADRV estão intimamente associadas quando comparadas com o gene correspondente da estirpe padrão GBR (*bovine group B*) (TSUNEMITSU et al., 2005). Estes dados são importantes para o estabelecimento das relações antigênicas entre as diferentes estirpes de RV gpB existentes e sua relação com os outros grupos de RV (EIDEN et al., 1992).

Com maior freqüência, técnicas de hibridação molecular têm sido utilizadas para analisar a diversidade genética em estirpes de RV gpC. Os resultados preliminares de sequências dos genes 5 (VP6) e 8 (VP7) dos protótipos Cowden (RV gpC suíno) e Shintoku (RV gpC bovino), e de algumas estirpes selvagens revelaram que, assim como no RV gpA, as

estirpes de RV gpC também apresentam diversidade genética que pode ser correlacionada com diferentes sorotipos (genotipos) circulantes (JIANG et al., 1993; OJEH et al., 1993; ALFIERI et al., 1999).

Diagnóstico

Vários métodos de diagnóstico laboratorial dos RV foram desenvolvidos, tanto para a detecção da partícula viral quanto de proteínas e do ácido nucléico. Os métodos variam quanto à especificidade, sensibilidade, facilidade de execução e custo final do diagnóstico (ALFIERI et al., 1999).

O isolamento do RV em cultura de celular somente foi difundido e utilizado como técnica de diagnóstico, após a utilização do tratamento do inóculo viral com enzimas proteolíticas, como a tripsina, que aumentam a probabilidade da propagação “*in vitro*” dos RV (SATO et al., 1981). O cultivo celular é uma técnica ainda bastante utilizada para o isolamento do RV gpA. As estirpes de RV gps B e C são de difícil adaptação em cultivo celular. Contudo, a tentativa de isolamento viral é uma técnica laboriosa, demorada e que requer a presença de partículas virais infectantes. Apesar desses inconvenientes, o isolamento do RV em cultivo celular é uma técnica de fundamental importância para a disponibilização de estirpes virais selvagens para estudos complementares de caráter antigênico e molecular (CUKOR; BLACKLOW, 1984).

A microscopia eletrônica é um importante método de diagnóstico para a identificação de estirpes virais não-cultiváveis em amostras clínicas (NAKATA et al., 1987). Como a quantidade de partículas víricas eliminadas por um animal na fase aguda da doença é muito grande, principalmente nas infecções pelo RV gpA, é possível a visualização direta do RV pela microscopia eletrônica. A integridade da partícula viral depende dos procedimentos utilizados no preparo da amostra sendo que o RV gpB é o menos estável. A ME é uma técnica altamente específica e permite a visualização da morfologia característica dos RV, sendo geralmente utilizada como contraprova, quando outras técnicas tradicionais apresentam resultados contraditórios (BRANDT et al., 1981; NAKATA et al., 1987).

O ensaio imunoenzimático (ELISA), devido à sua alta sensibilidade, facilidade de execução e ao grande número de amostras que podem ser analisadas simultaneamente, assim como pela rapidez na obtenção dos resultados, é uma técnica

amplamente difundida para o diagnóstico do RV gpA. Reações inespecíficas ou inibidores presentes no material fecal podem diminuir a sua especificidade (JURE et al., 1988). Devido à grande antigenicidade, a proteína VP6 tem sido utilizada como base para os *kits* comerciais de ELISA para o diagnóstico etiológico do RV gpA (MACKOW, 2002).

O perfil de migração do dsRNA, visualizado após a técnica de PAGE, define o eletroferotipo, também chamado padrão genômico, utilizado para caracterizar as estirpes de RV (RODGER et al., 1981; ESTES et al., 1984; ESTES; COHEN, 1989). Uma importante característica dos RV pertencentes ao grupo A é a migração dos segmentos 7, 8 e 9 em forma de *triplet* ou trinca. Essa co-migração em PAGE deve-se à semelhança de suas respectivas massas moleculares. Esta disposição é freqüentemente representada como 4-2-3-2, indicando o número de segmentos genômicos encontrados em cada classe do grupo A dos RV (KAPIKIAN; CHANOCK, 2001; HOSHINO; KAPIKIAN, 1994).

Por outro lado, os RV que não apresentam este *triplet* característico do RV gpA são classificados como RV atípicos ou RV não-grupo A (grupos B a G) (PEDLEY et al., 1986; TODD; McNULTY, 1986; McCRAE, 1987; SAIF, 1990). Com relação aos RV atípicos encontrados em mamíferos, os eletroferogrupos mais importantes constituem o grupo B, com disposição 4-2-2-3, e o grupo C que apresenta uma distribuição genômica identificada como 4-3-2-2 (Figura 1) (McNULTY et al., 1984; CHASEY et al., 1986; PEDLEY et al., 1986).

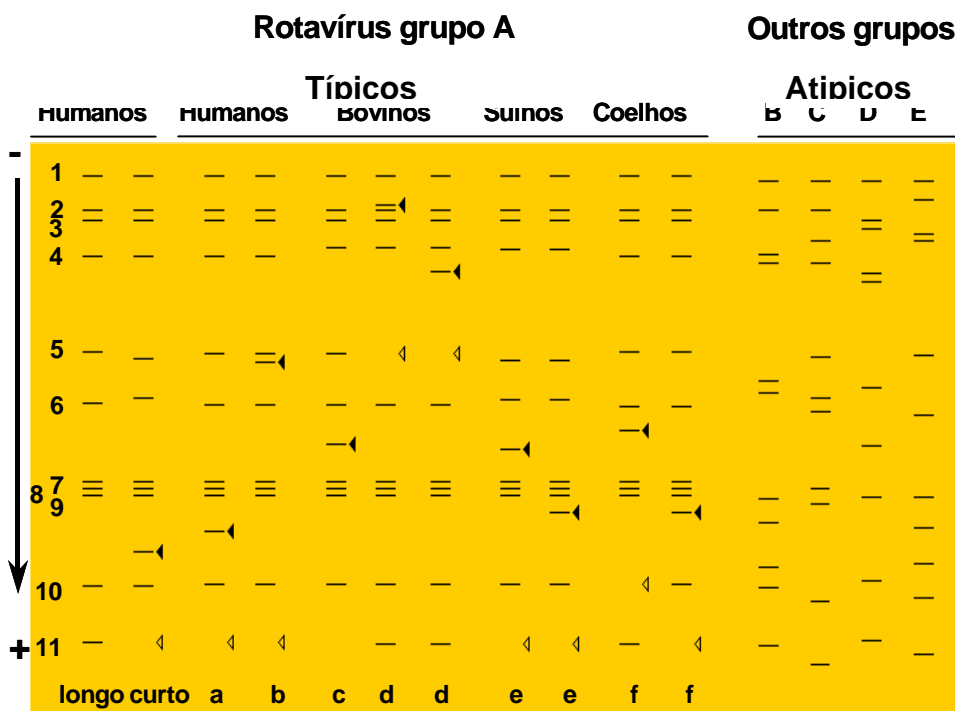


Figura 1 – Perfis eletroforéticos do genoma viral (dsRNA) dos rotavírus

A eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE), seguida de coloração pela prata, é uma das técnicas mais utilizadas para a detecção dos segmentos do ácido nucléico (dsRNA) dos RV. A PAGE, por meio da análise do perfil de migração dos 11 segmentos genômicos do RV, apresenta a vantagem adicional de possibilitar a determinação do eletroferotipo da estirpe viral, bem como possibilita ainda a identificação dos grupos A, B e C (KALICA et al., 1976; HERRING et al., 1982). Contudo, a eletroferotipagem, apesar de ser extremamente importante na definição de grupo ou eletroferogrupo, não possibilita a definição do sorotipo viral. Estirpes virais de um mesmo sorotipo podem apresentar perfis eletroforéticos diferentes, enquanto que estirpes com perfis semelhantes podem pertencer a diferentes sorotipos (BEARDS, 1982; MARKOWSKA-DANIEL et al., 1996).

Atualmente, técnicas de biologia molecular como a reação em cadeia da polimerase, precedida de transcrição reversa, (RT-PCR) para a detecção do genoma viral têm sido desenvolvidas para o diagnóstico dos RV. A PCR não exige a viabilidade da partícula viral pois a análise é feita pela amplificação do genoma, minimizando os problemas ocasionados por falhas na conservação das amostras fecais que diminuem a infectividade ou promovem a degradação das proteínas virais. Adicionalmente, resultados conclusivos podem ser obtidos em poucas horas. Substâncias inibidoras, encontradas principalmente em fezes, podem alterar a eficiência da RT-PCR. Porém, métodos eficazes de extração do RNA e o uso de controles internos na reação da PCR podem contornar esse inconveniente. A RT-PCR tem demonstrado ser um método altamente sensível e específico na detecção dos grupos A, B e C de RV de diferentes origens, seres humanos e animais, tanto a partir de infecções agudas quanto sub-clínicas ou persistentes (WINIARCZYK; GRADZKI, 1999; ELSCHNER et al., 2002).

Além disso, a RT-PCR, por ser uma técnica altamente sensível e específica, tem contribuído para otimizar o diagnóstico da rotavirose, contribuindo com a real estimativa da prevalência das infecções, bem como com a definição dos sorotipos/genotipos de RV circulantes em uma população ou rebanho, sua distribuição geográfica e sazonal (DESSELBERGER et al., 2001). Paralelamente, a RT-PCR tem demonstrado ser uma técnica eficiente na identificação de estirpes virais com genótipos incomuns e também de infecções mistas, com estirpes de RV pertencentes a diferentes genótipos (HEIDE et al., 2005).

Rotavirose suína

A rotavirose suína caracteriza-se por comprometer animais jovens, afetando principalmente a faixa etária entre a segunda e a quarta semanas de vida (BOHL, 1979; UTRERA et al., 1984; WIELER et al., 2001). A morbidade da rotavirose suína é alta, principalmente nas primo-infecções, porém a mortalidade é baixa, ficando entre 7-20% (BOHL, 1978). As matrizes prenhes, quando portadoras, eliminam o RV por meio das fezes para o ambiente, principalmente nos dias que antecedem ao parto, sendo uma fonte de infecção para os leitões (RUBIO et al., 1988). Em infecções naturais os animais eliminam o RV tanto nas fezes normais quanto diarréicas (DEWEY et al., 2003).

A transmissão do RV ocorre por via fecal-oral, com a ingestão de água e/ou alimentos contaminados com fezes de animais infectados. Há relatos da possibilidade da transmissão por aerossóis, principalmente quando as condições de umidade e ventilação ambiente são favoráveis (GORDON, 1982; COOK *et al.*, 1996; KAPIKIAN *et al.*, 2001). 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).

A propagação dos RV ocorre principalmente em ambientes com grande concentração de animais e com condições de higiene desfavoráveis, infectando as células epiteliais das vilosidades intestinais (KAPIKIAN et al., 2001; MACKOW, 2002). Somente partículas com triplo capsídeo conseguem aderir-se às células. A proteína VP4 tem função essencial no ciclo de replicação do vírus, incluindo a ligação ao receptor e a penetração celular. A função da VP7, durante a interação inicial, ainda não está bem estabelecida (ZARATE *et al.*, 2004). RV apresenta tropismo por enterócitos maduros das porções média e alta das vilosidades do intestino delgado, principalmente terço final de jejuno e inicial de íleo, de animais e de seres humanos jovens (LUNDGREN; SVENSSON, 2001). No processo de replicação viral ocorre a lise das células hospedeira. A redução da capacidade de absorção dos enterócitos e a descamação do epitélio intestinal, com atrofia das vilosidades, causam o quadro diarréico (BISHOP *et al.*, 1973; MACKOW, 2002).

Os sinais clínicos iniciam por volta do terceiro dia pós-infecção e os animais podem excretar o vírus por até oito dias após o término dos sinais clínicos (DEWEY et al., 2003). Os animais apresentam, principalmente, diarréia de consistência pastosa à líquida e de

curta duração, em média por três dias. A desidratação é freqüente em leitões muito jovens, onde a infecção é mais grave (THEIL et al., 1985).

Em todo o mundo, e independentemente do grau de tecnificação do manejo implementado, as diarreias em leitões alojados na maternidade e na creche ocasionadas pelos RV são muito constantes. Considerando a freqüência de ocorrência, as diarreias pelo RV gpA assumem grande importância na epidemiologia da rotavirose suína. Porém, nessas etapas da criação dos leitões as diarreias ocasionadas por RV gpB e RV gpC destacam-se como as de maior ocorrência, em comparação com outras espécies animais (SAIF; JIANG, 1994; ALFIERI et al., 1996; CHANG et al., 1997). O quadro 2 apresenta dados relativos à freqüência de diagnóstico de RV gps B e C em leitões.

Os sorotipos/genotipos de RV gpA mais freqüentemente encontrados em suínos são G3, G4 e G5 que estão associados com P9[7] ou P2B[6] (SAIF et al., 1994). Outros P tipos têm sido descritos em RV isolados ou presentes em amostras fecais como P7[5]; P1A[8]; P[13]; P12[19]; P14[23] (LIPRANDI et al., 2003; MARTELLA et al., 2005). O quadro 2 apresenta dados relativos à freqüência de diagnóstico de RV gps B e C em leitões.

Os suínos compreendem a espécie de mamíferos onde, além da soroprevalência, as taxas de ocorrência de diarreia determinada por RV gpC são as mais altas. Em algumas situações a infecção pode apresentar caráter enzoótico, sugerindo ainda que a maioria das infecções são sub-clínicas ou, simplesmente, não são detectadas pelos métodos de diagnósticos rotineiramente utilizados (CHASEY; DAVIS, 1984; DeBOUCK et al., 1984; SIGOLO de SAN JUAN et al., 1986; SAIF, 1990; SAIF; JIANG, 1994).

Local	RV / Grupo	Técnica de Diagnóstico	% de amostras positivas	Referência
África do Sul	B	PAGE	4,6 (8/172)	Geyer et al., 1996
	C		10,8 (18/172)	
Australia	B	Hibridação	18,7 (3/16)	Nagesha et al., 1981
	C	PAGE	43,7 (7/16)	
Brasil	B	RT-PCR		Alfieri et al., 1999
	C	+ Hibridação	50,0 (17/34)	
Brasil	B	PAGE	7,7 (1/13)	Gatti et al., 1989
Canadá	B	PAGE	46,7 (56/120)	Magar et al., 1991
	C			
EUA	C	IF	81,8 (9/11)	Kim et al., 1999
		RT-PCR	100 (11/11)	
EUA	B	ELISA	50,0 (2/4)	Vonderfecht et al., 1994
	C		25,0 (1/4)	
EUA	B	PAGE	6,2 (6/96)	Will et al., 1994
	C		5,2 (5/96)	
	mista		1,0 (1/96)	
EUA	B	RT-PCR	57,1 (4/7)	Gouveia et al., 1991
	C		42,8 (3/7)	
EUA	B	PAGE	10,0 (9/90)	Janke et al., 1990
	C		11,0 (10/90)	
	mista		11,0 (10/90)	
EUA	B	IF	23,0 (10/44)	Theil et al., 1985
Italia	C	RT-PCR	28,7 (54/188)	Martella et al., 2007
		Mista	12,2 (23/188)	
Japão	B	PAGE/	4,8 (41/845)	Sanekata et al., 1996
	C	RT-PCR	3,4 (29/845)	
Japão	C	ELISA	70,3 (104/148)	Tsunemitsu et al., 1992
México	B	PAGE	2,3 (6/256)	Morilla et al., 1991
Tailândia	B	PAGE	0,2 (1/557)	Pongsuwanna et al., 1996
	C		0,3 (2/557)	

Quadro 2 – Freqüência de diagnóstico de rotavírus grupos B e C em leitões com idade inferior a quatro semanas de idade, de acordo com o local de origem das amostras estudadas.

Algumas características dos RV como a resistência da partícula viral às condições ambientais e aos produtos químicos como os desinfetantes; a alta taxa de excreção viral do RVgp A durante a fase aguda da infecção; a possibilidade de infecções sub-clínicas; assim como da transmissão interespecie fazem com que os episódios de diarreia causados pelos RV apresentem particularidades não encontradas em outras infecções entéricas ocasionadas por bactérias ou protozoários. Conseqüentemente, a profilaxia das rotavirose não se restringe apenas na adção de medidas higiênico-sanitárias, pois os RV são responsáveis por surtos de diarreia com impacto em saúde pública e em sanidade animal mesmo em países desenvolvidos e/ou em criações com manejo zootécnico e sanitário adequados (BERN et al., 1994; GLASS et al., 1994).

A vacinação de fêmeas no terço-final da gestação é uma das principais condutas a serem implementadas no desenvolvimento de um programa sanitário que inclui o controle e profilaxia da diarreia de leitões lactentes (BARREIROS et al., 2003). Devido a prevalência estatisticamente superior das diarreias pelo RV gpA, em relação às ocasionadas pelos grupos B e C, somente são disponíveis no mercado vacinas contra o RV gpA. Resultados satisfatórios, com redução tanto na freqüência quanto na intensidade de diarreia, têm sido observados quando programas imunoproláticos utilizando vacinas polivalentes são adequadamente incluídos no manejo sanitário de fêmeas gestantes (Alfieri, A.A., comunicação pessoal).

Considerando que: i) além do grupo A, os grupos B e C de RV também podem contribuir consideravelmente com episódios de diarreias em leitões lactentes e recém-desmamados; ii) as infecções por esse grupos de RV atípicos podem ocorrer tanto de forma singular quanto, principalmente de forma múltipla; iii) não são disponíveis imunógenos para o controle e profilaxia das rotavirose ocasionadas pelos grupos B e C; iv) não há disponibilidade de técnicas de diagnóstico com sensibilidade e especificidade adequadas para o uso na rotina laboratorial para os grupos B e C de rotavírus; v) o desconhecimento da epidemiologia da rotavirose suína ocasionadas pelos grupos B e C; vi) a alta freqüência de ocorrência de diarreias em leitões lactentes em todo o Brasil, e vii) o impacto sanitário das diarreias neonatais na suinocultura brasileira; a avaliação da freqüência de diagnóstico do RV grupos A, B e C, tanto em infecções singulares quanto mistas, em episódios de diarreias em leitões lactentes é de fundamental importância para a definição tanto do impacto da infecção na produção de leitões quanto para a definição dos principais aspectos epidemiológicos da infecção.

REFERÊNCIAS

- ALAM, M.M.; KOBAYASHI, N.; ISHIMO, 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 B 219 detected in a sporadic case of adult diarrhea in Bangladesh. **Archives of Virology**, v.152, n.1, p.199-208, 2006.
- ALFIERI, A.A.; LEITE, J.P.G.; NAKAGOMI, O.; KAGA, E.; WOODS, P.A.; GLASS, R.I.; GENTSCH, J.R. Characterization of human rotavirus genotype P[8]G5 from Brazil by Probe-Hybridization and Sequence. **Archives of Virology**, v.141, p.2353-2364, 1996.
- ALFIERI, A.F. Caracterização dos genótipos P e G de rotavírus do grupo A de origem animal (bovina e suína) e de origem humana pela reação em cadeia pela polimerase. São Paulo, SP, Brasil, 1999, 134p. **Tese** (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.
- 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.
- ARNOLDI, F.; CAMPAGNA, M.; EICHWALDT, C.; DESSELBERGER, U.; BURRONE, O.R. Interaction of rotavirus polymerase VP1 with nonstructural protein NSP5 is stronger than that with NSP2. **Journal of Virology**, v.85, n.5, p.2128-2137, 2007.
- BEARDS, G.M. Polymorphism of genomic RNAs within rotavirus serotypes and subgroups. **Archives of Virology**, v.7, p.465-470, 1982.
- BERN, C.; GLASS, R.I. Impact of diarrheal Diseases worldwide. In: **Viral Infections of the Gastrointestinal Tract** (Kapikian, A.Z. Ed.), 2nd ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1994, p.1-26.
- BISHOP, R.F.; DAVIDSON, G.P.; HOLMES, I.H.; RUCK, B.J. Detection of a new virus by electron microscopy of fecal extracts from children with acute gastroenteritis. **Lancet**, v.2, p.1281-1283, 1973.
- BOHL, E.H.; KOHLER, E.M.; SAIF, L.J.; CROSS, R.F.; AGNES, A.G.; THEIL, K.W. Rotavirus as a cause of diarrhea in pigs. **Journal American Veterinary Medical Association**, v.172, p.458-463, 1978.

BRANDT, C.D.; KIM, H.W.; RODRIGUEZ, W.J.; THOMAS, L.; YOLKEN, R.H.; ARROBIO, J.O.; KAPIAKAN, A.Z.; PARROT, R.H.; CHANOCK, R.M. Comparison of direct electron microscopy and rotavirus enzyme-linked immunosorbent assay for detection of gastroenteritis viruses in children. **Journal of Clinical Microbiology**, v.13, p.976-981, 1981.

BRIDGER, J. C. Novel rotaviruses in animals and man. In: Ciba Found. Symp. Novel diarrhea viruses, 1987, Chichester, UK. **Anais...**1987, v.128, p.5-23.

CALDERARO, F.F.; BACARRO, M.R.; MORENO, A.M.; FERREIRA, A.J.P.; JEREZ, A.J.; PENA, H.J.F. Frequência de agentes causadores de enterites em leitões lactentes provenientes de sistemas de produção de suínos do Estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo**, v.68, n.1, p.29-34, 2001.

CAMPAGNA, M.; EICHWALD, C.; VASCOTTO, E.; BURRONE, O.R. RNA interference of rotavirus segment 11 mRNA reveals the essential role of NSP5 in the virus replicative cycle. **Journal of General Virology**, v.86, p.1481-1487, 2005.

CHANG, K.O.; PARWANI, A.V.; SMITH, D.; SAIF, L.J. Detection of group B rotavirus 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.; DAVIES, P. Atypical rotaviruses in pigs. **Veterinary Records**, v.114, p.16-17, 1984.

CHASEY, D.; BRIDGER, J.C.; McCRAE, M.A. A new type of atypical rotavirus and villous epithelial cell syncytia in piglets. **Journal of Comparative Pathology**, v.100, p.217-222, 1986.

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, 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.; LIPRANDI, F.; CONNER, M.E.; ESTES, M.K. Species specificity and interspecies relatedness of NSP4 genetic groups by comparative NSP4 analyses of animal rotaviruses. **Archives of Virology**, v.145, p.371-383, 2000.

CICIRELLO, H.G.; GLASS, R.I. Current concepts of the epidemiology of diarrheal diseases. **Seminary Pediatric Infection Disease**, v.5, p.163-167, 1994.

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.

CUKOR, G.; BLACKLOW, N.R. Human viral gastroenteritis. **Microbiological Review**, v.48, p.157-179, 1984.

DeBOUCK, P.; CALLEBAUT, P.; PENZAERT, M. The pattern of rotavirus and pararotavirus excretion in pigs in closed swine herds. In: 4th International Symposium on Neonatal Diarrhea, 1984, Saskatchewan, Canadá, **Proceedings...** Canadá: Acres SD (Ed.). 1984, p.77-89.

DESSELBERGER, U.; ITURRIZA-GOMARA, M.; GRAY, J. Rotavirus epidemiology and surveillance. In: Novartis Foundation Symposium, 2001. **Anais...**[SI]: 2001, v. 238, p.125-127.

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.

DRIESEN, S.J.; CARLAND, P.G.; FAHY, V.A. Studies on preweaning piglet diarrhoea. **Australian Veterinary Journal**, v.70, n.7, p.259-262, 1993.

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.

ELSCHNER, M.; PRUDLO, J. HOTZEL, H.; OTTO, P.; SACHSE, K. Nested Reverse transcription-polymerase chain reaction for the detection of group A rotaviruses. **Journal Veterinary Medicine B**, v.49, p.77-81, 2002.

ESTES, M.K.; GRAHAN, D.Y.; MASON, B.B. Proteolytic enhancement of rotavirus infectivity: molecular mechanisms. **Journal of Virology**, v.38, p.879-888, 1981.

ESTES, M.K.; GRAHAM, D.Y.; DIMITROV, D.H. The molecular epidemiology of rotavirus gastroenteritis. **Progress in Medical Virology**, v.29, p.1-22, 1984.

ESTES, M.K.; COHEN, J. Rotavirus gene structure and function. **Microbiological Review**, v.53, p.410-449, 1989.

ESTES, M.K. Rotaviruses and their replication. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (Ed.) **Fields Virology**. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams ; Wilkins, 2001, p.1747-1785.

GATTI, M.S.; HARA, N.H.; FERRAZ, M.M.; PASTANA de CASTRO, A.F. Presence of ggroup A and non A rotaviruses in neonatal piglets in Campinas, SP, Brazil. **Medical Microbiology and Immunology**, v.178, n.6, p.347-349, 1989.

GEYER, A.; SEBATA, T.; PEENZE, I.; STEELE, A.D. Groups B and C porcine rotavirus identified for the first time in South African. **Journal of the South African Veterinary Association**, v.67, n.3, p.115-116, 1996.

GLASS, R.I.; GENTSCH, J.R.; SMITH, J. Rotavirus Vaccines: Success by Reassortment? **Science**, v.265, p.1389-1391, 1994.

GORDON, A.G. Rotavirus infection and the some syndrome. **Journal of Infectious Diseases**, v.146, p.117-118, 1982.

GOUVEIA, V.; ALLEN, J.R.; GLASS, R.I.; FANG, Z.Y.; BREMONT.M.; COHEN, J.; McCRAE, M.A.; SAIF, L.J.; SINARACHATANANT, P.; CAUL, E.O. Detection of groups B and C rotavirus by polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v.29, p.519-523, 1991.

HEIDE, R.V.; KOOPMANS, M.P.G.; SHEKARY, N.; HOUWERS, D.J.; VAN DUYNHOVEN, Y.T.H.P.; van der POEL, W.H.M. Molecular characterization of human and animal group A rotaviruses in the Netherlands. **Journal of Clinical Microbiology**, n.43, v.2, p.669-675, 2005.

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

HO, M.S.; GLASS, R.I.; PINSKY, P.F.; ANDERSON, L.J. Rotavirus as a cause of diarrheal morbidity and mortality in the Unites State. **Journal of Infectious Disease**, v.158, p.1112-1116, 1988.

HOSHIMO, Y.; SERENO, M.M.; MIDTHUN, K.; FLORES, J.; KAPIKIAN, A.Z.; CHANNCK, R.M. Independent segregation of two antigenic specificities (VP 3 and VP 7) involved in neutralization of rotavirus infectivity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.82, p.8701-8704, 1985.

HOSHIMO, Y.; KAPIKIAN A.Z. Rotavirus antigens. **Current Topics in Microbiological Immunological**, v.185, p.179-227, 1994.

HOSHIMO, Y.; HONMAS, S.; JONES, R.W.; ROSS, J.; SANTOS, N.; GENTSH, J.R.; KAPIKIAN, A.Z.; ILESSE, A. A porcine G9 rotavirus strain shares neutralization and VP7 phylogenetic sequence lineage characteristics with contemporary human G9 rotavirus strain. **Virology**, v.332, p.177-188, 2005.

ICTVdB – The Universal Virus Database, version 4. Disponível em: <<http://www.Ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/>>. Acesso em 15.jul.2007.

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

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

JIANG, B.; TSUNEMITSU, H.; GENTSCH, J.R.; SAIF, L.J.; GLASS, R.I. Nucleotide sequences of genes 6 and 10 of a bovine group C rotavirus. **Nucleic Acid Research**, v.21, p.9, 1993.

JIANG, B.; WANG, Y.; GLASS, R.I.; FANG, Z.Y. The evolution of human group B rotaviruses: correlation and an update. **Journal of Clinical Virology**, v.34, p.158-159, 2005.

JURE, M.N.; MORSE, S.S.; STARK, D.M. Identification of nonspecific reaction in laboratory rodent specimens tested by rotavirus ELISA. **Laboratory Animal Science**, v.38, p.273-278, 1988.

KALICA, A.R.; GARON, C.F.; WYATT, R.G.; MEBUS, C.A.; VAN KIRK, D.H.; CHANOCK, R.M.; KAPIKIAN, A.Z. Differentiation of human and calf reovirus-like agents associated with diarrhea using polyacrylamide gel electrophoresis of RNA. **Virology**, v.74, p.86-92, 1976.

KANG, G.; KELKAR, S.D.; CHITAMBAR, S.D.; RAY, P.; NAIK, T. Epidemiological profile of rotaviral infection in India: challenges for the 21st century. **The Journal of Infectious Diseases**, v.192, n.1, p.120-126, 2005.

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

KATOULI, M.; LUND, A.; WALLGREN, P.; KÜHN, I.; SODERLIND, O.; MÖLLBY, R. Phenotypic characterization of intestinal *Escherichia coli* of pigs during suckling, postweaning and fattening periods. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, n.2, p.778-783, 1995.

KELKAR, S.D.; ZADE, J.K. Group B rotavirus similar to strain CAL-1 have circulating in Western India since 1991. **Epidemiological and Infection**, v. 132, p.745-749, 2004.

KHAMRIN, P.; MANEEKAN, N.; PEERAKONE, S.; CHAIN-IT, W.; YAGYI, F.; OKITSU, S.; USHIJIMS, H. Novel porcine rotavirus of genotype P[27] shares new phylogenetic lineage with G2 porcine rotavirus strain. **Virology**, v.10, p.243-252, 2007.

KIM, Y.; CHANG, R.; STRAW, B.; SAIF, L. Characterization of group C rotavirus associated with diarrhea outbreaks in feeder pigs. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, n.5, p.1484-1488, 1999.

LIPRANDI, F.; GELDER, M.; BATISTAS, Z.; LOPEZ, J.A.; PUJOL, F.H.; LUDERT, J.E.; JOELSSON, D.B.; CIARLET, M. A novel type of VP4 carried by a porcine rotavirus strain. **Virology**, v.315, p.1658-1661, 2003.

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

MACKOW, E. 2002 Rotaviruses. Disponível em:
<[http:// www.uhme.sunysb.edu/microbiology/rotavirus](http://www.uhme.sunysb.edu/microbiology/rotavirus)> Acesso em 06 outubro 2006.

MAGAR, R.; ROBISON, Y.; MORIN, M. Identification of atypical rotaviruses in outbreaks of preweaning and postweaning diarrhea in Quebec swine herds. **Canadian Journal Veterinary Research**, v.55, p.260263, 1991.

MARKOWSKA-DANIEL, I.; WINIARCZYK, S.; GRADZKI, Z.; PEJSAK, Z. Evaluation of different methods (ELISA, IF, EM, PAGE) for the diagnosis of rotavirus infectious in piglets. **Comp. Immunology Microbiology Infectious Disease**, v.19, n.3, p.219-232, 1996.

MARTELLA, V.; CIARLET; CAMARDA, A.; PRATELLI, A.; TEMPESTA, M.; GREGO, G.; CAVALLI, A.; ELIA, G.; DECARO, N.; TERIO, V.; BOZZO, G.; CAMERO, M.; BUONAVOGLIA, C. Molecular characterization of the VP4, VP6, VP7, and NSP4 genes of lapine rotavirus identified in Italy; emergence of a novel VP genotype. **Virology**, v.314, p.358-370, 2003.

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

MARTELLA, V.; CIARLET, M.; BANYAI, K.; LORUSSO, E.; CAVALLI, M.; CORRENTE, M.; ELIA, G.; ARISTA, S.; CAMERO, M.; DESARIO, C.; DECARO, N.; LAVAZZA, A.; BUONAVOGLIA, C. Identification of a novel VP4 genotype carried by a serotype G5 porcine rotavirus strain. **Virology**, v.346, p.301-311, 2006.

MARTELLA, V.; BANYAI, K.; LORUSSO, E.; BELLACICCO, A.L.; DECARO, N.; CAMERO, M.; BOZZO, G.; MOSCHIDOU, P.; ARISTA, S.; PEZZOTI, G.; LAVAZZA, A.; BUONAVOGLIA, C. Prevalence of group C rotavirus in weaning and post-weaning pigs with enteritis. **Veterinary Microbiology**, v.123, p.26-33, 2007.

McCRAE, M.A. Nucleic acid-based analysis of non-group A rotaviruses. In: **Ciba Found. Symp.** Novel diarrhea Viruses. Chichesters, UK: Wiley;Sons, v.128, p.24-48, 1987.

McNULTY, M.S. Rotaviruses. **Journal of General Virology**, v.40, p.1-18, 1978.

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

MELIN, L.; KATOULI, M.; LINDEBERG, A.; FOSSUN, C.; WALLGREN, P. Weaning of piglets. Effects of an exposure to a pathogenic strain of Escherichia coli. **Journal of Veterinary Medicine B**, v.47, p.663-675, 2000.

MELIN, L.; MATTSSON, S.; KATOULI, M.; WALLGREN, P. Development of post-weaning diarrhoea in piglets. Relation to presence of Escherichia coli strain and Rotavirus. **Journal of Veterinary Medicine B**, v.51, p.12-22, 2004.

MIDTHUN, K.; KAPIAKAN, A.Z. Rotavirus vaccine: an overview. **Clinical Microbiology Reviews**, v.9, p.423-434, 1996.

MORILLA, A.; ARRIAGA, C.; RUIZ, C.; MARTINEZ, A.G.; CIGARROA, R.; VALAZQUEZ, A. Association between diarrhoea and shedding of group A and atypical groups B to E rotavirus in suckling pigs. **Annals of Veterinary Research**, v.22, n.2, p.13-200, 1991.

NAGESHA, H.S.; HUN, C.P.; BRIDGER, J.C.; HOLMES, I.H. Atypical rotavirus in Australian pigs. **Archives of Virology**, v.102, p.91-98, 1981.

NAKATA, S.; PETRIE, B.L.; CALOMENI, E.P.; ESTES, M.K. Electron Microscopy procedure influences detection of rotavirus. **Journal of Clinical Microbiology**, v.25, n.10, p.1902-1906, 1987.

OFFIT, P.A.; BLAVAT, G. Identification of two rotavirus genes determining neutralization specificities. **Journal of Virology**, v.57, p.376-378, 1986.

OJEH, C.K.; PARWANI, A.V.; JIANG, B.M.; THEIL, K.W.; ROSEN, B.I.; SAIF, L.J. Characterization of field isolates of porcine group C rotaviruses using gene 5 (VP6) and gene 8 (VP7) cDNA probes. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.5, p.434-438, 1993.

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

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.

PRASAD, B.V.V.; CHIU, W. Structure of rotavirus. **Current Topics Microbiological Immunology**, v.85, p.1-27, 1994.

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

RODGER, S.M.; BISHOP, R.F.; BIRCH, C.; McLEAN, B.; HOLMES, I.H. Molecular epidemiology of human rotaviruses in Melbourne, Australia, from 1973 to 1979, as determined by electrophoresis of genome ribonucleic acid. **Journal of Clinical Microbiology**, v.13, p.272-278, 1981.

RUBIO, P.; ALVAREZ, M.; CARMENES, P. Relacion entre la eliminacion de rotavirus por cerdas madres y sus camadas em condiciones de exploration conventionales. In: 10th Congress Internacional of Pig Veterinary Society, X, 1988, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro, Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos, 1988, p.215.

SAIF, L.J.; THEIL, K.W. Antigenically distinct rotavirus of human and animal origin. In: TZIPORI, S (ed.). **Proc. Infectious diarrhea in the young: strategies for control in human and animal**, Amsterdam: Elsevier Science, Amsterdam: 1985, p.208-214.

SAIF, L.J. Nongroup A rotavirus. In: L.J. SAIF; K.W. THEIL (Ed.), **Viral diarrheas of man and animals**: New York, CRC Press, Boca Raton, New York: 1990, p.73-95.

SAIF, L.J.; JIANG, B. Nongroup A Rotaviruses of Humans and Animals. **Current Topics Microbiological 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, n.3, p.759-761, 1996.

SATO, K.; INABA, Y.; SHINOZAKI, T.; FUJII, R.; MATUMOTO, M. Isolation of human rotavirus in cell culture: brief report. **Archives of Virology**, v.69, p.155-160, 1981.

SEN, A.; KABAYASHI, N.; DAS, S.; KRISHNAN, T.; BHATTACHARYA, S. K.; NAIK, T.N. The evolution of group B rotavirus. **Lancet**, v.357, p.198-199, 2001.

SIGOLO de SAN JUAN, C.; BELLINZONI, R.C.; MATION, N.; LA TORRE, J.; SCODELLER, E.A. Incidence of group A and atypical rotaviruses in Brazilian pig herds. **Research Veterinary Science**, v.41, p.270-272, 1986.

SILVETRI, L.S.; TARAPOREWALA, Z.F.; PATTON, J.T. Rotavirus replication: plus-sense templates for double-stranded RNA synthesis are made in viroplasms. **Journal of Virology**, v.78, p.7763-7774, 2004.

SPENCER, B.T.; HOWELL, P.G.; HILLMAN, K.; MURDOCH, T.A.; SPENCER, R.J.; STEWARD, C.S. Some husbandry factors influencing weaning stress in piglets. **Journal South African Veterinary Association**, v.60, p.62-64. 1989.

THEIL, K.W; SAIF, L.J; MOORHEAD, P.D.; WHITMOYER, R.E. Porcine rotavirus-like virus (group B rotavirus): characterization and pathogenicity for gnotobiotic pigs. **Journal of Clinical Microbiology**, v.21, n.3, p.340-345, 1985.

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.

TODD, D.; McNULTY, M.S. Electrophoretic variation of avian rotavirus RNA in polyacrylamide gel. **Avian Pathology**, v.15, p.149-151, 1986.

TSUNEMITSU, H.; JIANG B.; SAIF, L.J. Detection of group C rotavirus antigens and antibodies in animals and humans by enzyme-linked immunosorbent assays. **Journal of Clinical Microbiology**, v.30, n.8, p.2129-2134, 1992.

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.

TSUNEMITSU, H.; KAMIYAMA, M.; KAWASHIMA, K.; KATSUDA, K.; KOHMOTO, M.; SAIF, L.J.; SHOUJI, T.; ONODERA, T. Molecular characterization of the major capsid protein VP6 of bovine group B rotavirus and its use in seroepidemiology. **Journal of General Virology**, v.86, p.2569-2575, 2005.

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.

VONDERFECHT, S.L.; LINDSAY, D.A.; EIDEN, J.J. Detection of rat, porcine and human group B rotavirus in fecal specimens by solid-phase enzyme immunoassay. **Journal of Clinical Microbiology**, v.32, n.4, p.1107-1108, 1994.

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, series B**, v.48, p.151-159, 2001.

WILL, L.A.; PAAUL, P.S.; PROESCHLDT, T.A.; AKTAR, S.N.; FLAMING, K.P.; JANKE, B.H.; SACKS, J.; LYOO, Y.S.; HILL, H.T.; HOFFMAN, L.J.; WU, L.L. Evaluation of rotavirus infection and diarrhea in Iowa commercial pigs based on an epidemiologic study of a population represented by diagnostic laboratory cases. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.6, p.416-422, 1994.

WINIARCZYK, S.; GRADZKI, Z. Comparison of polymerase chain reaction and dot hybridization with enzyme-linked immunoassay, virological examination and polyacrylamide gel electrophoresis for the detection of porcine Rotavirus in faeces specimens. **Journal of Veterinary Medicine B**, v.46, p.623-634, 1999.

ZARATE, S. VP7 mediates the interaction of Rotaviruses with integrin $\alpha\beta3$ through a novel integrin-binding site. **Journal of Virology**, v.78, n.20, p.10839-10847, 2004.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar por RT-PCR a ocorrência de rotavírus suíno grupo A e rotavírus atípicos em amostras fecais de leitões lactentes que apresentaram resultados inconclusivos em PAGE, e realizar análises filogenéticas em seqüências genômicas parciais de rotavírus grupos B e C.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a freqüência de diagnóstico molecular de rotavírus grupos A, B e C em amostras de fezes provenientes de leitões lactentes, previamente analisadas por PAGE e que apresentaram resultados inconclusivos;
- Determinar, por RT-PCR, a freqüência de infecções isoladas e mistas por rotavírus grupos A, B e C em leitões lactentes;
- Avaliar seqüências parciais dos genes NSP2 e VP6 de estirpes de rotavírus suíno grupos B e C, respectivamente, e estabelecer a relação filogenética com estirpes de rotavírus provenientes de regiões geográficas e hospedeiros distintos.

3 ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO

3.1 INFECÇÕES SINGULARES E MISTAS POR ROTAVÍRUS GRUPOS A, B E C IDENTIFICADAS POR RT-PCR EM FEZES DIARRÉICAS DE LEITÕES LACTENTES

Resumo

Rotavírus é um dos principais agentes etiológicos das diarreias em leitões lactentes de todo o mundo. Devido à facilidade na identificação, com frequência, apenas o grupo A de rotavírus é incluído nos estudos epidemiológicos da rotavirose em leitões. O objetivo desse estudo foi avaliar a frequência de diagnóstico de rotavírus grupos A, B e C em uma coleção de amostras fecais colhidas de leitões lactentes com uma a quatro semanas de vida em granjas com bom nível de tecnificação e localizadas em quatro estados de duas regiões geográficas brasileiras. As amostras ($n=588$) haviam sido previamente analisadas pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) e foram selecionadas 144 amostras que apresentaram resultados inconclusivos. A identificação dos grupos A, B e C foi realizada por meio de técnicas de RT-PCR. Para o grupo A foram utilizados os *primers* consensuais para G (VP7) tipo, descritos por Gouveia et al. (1990) e Das et al. (1994), e P (VP4) tipo descritos por Gentsch et al. (1994). O diagnóstico do grupo B foi realizado por meio da semi nested-PCR descrita por Gouveia et al. (1991), que amplifica um fragmento com 434 pb do gene 8 (NSP2). O grupo C foi identificado por meio da amplificação por RT-PCR de um produto com 270 pb do gene 5 (VP6) de acordo com Alfieri et al. (1999). Considerando o resultado dos três sistemas de diagnóstico, das 144 amostras analisadas 103 (71,5%) foram consideradas positivas e 41 (28,5%) negativas para os três grupos avaliados de rotavírus. Infecções singulares foram identificadas em 58 (40,3%) amostras sendo que em 34 (23,6%) amostras foi identificado o grupo A, em 19 (13,2%) o grupo B e em 5 (3,5%) amostras o grupo C. Em 45 (31,2%) amostras prevaleceram as infecções mistas com dois e até mesmo os três grupos de rotavírus. Rotavírus dos grupos B e C foram identificados com maior frequência (42,4%) em infecções mistas. As taxas de diagnóstico de rotavírus grupos B e C, tanto em infecções singulares quanto principalmente em infecções mistas, foram muito superiores às relatadas na literatura. O critério de inclusão das amostras e a utilização de técnicas de amplificação molecular para o diagnóstico contribuíram para essa maior frequência de ocorrência de rotavírus grupos B e C, que são esporadicamente relacionados às diarreias em leitões lactentes. A identificação de amostras positivas para os grupos B e C em um grande número de rebanhos provenientes de todos os estados incluídos na análise demonstra que, a exemplo do rotavírus grupo A, os rotavírus grupos B e C também estão amplamente disseminados nos rebanhos suínos brasileiros. Esses resultados sugerem que a não identificação rotineira do rotavírus grupos B e C em episódios de diarreia em leitões lactentes deve-se muito mais à utilização de métodos de diagnóstico menos sensíveis do que à sua menor prevalência.

Palavras-chave: Leitões. Diarreia. Rotavírus grupo A. Rotavírus atípicos. RT-PCR.

Single and mixed infections by rotavirus groups A, B, and C identified by RT-PCR in diarrheic feces of suckling piglets.

Abstract

Rotaviruses is one of the main etiological agents of diarrhea in suckling pigs worldwide. Due the easiness in the identification frequently only group A rotavirus is included in epidemiological studies of piglet diarrhea. The aim of this study was to evaluate the diagnosis frequency of groups A, B, and C rotaviruses in diarrheic suckling piglets from porcine herds localized in four states (Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná e Mato Grosso), from two Brazilian geographic regions (South and Center-west). For the definition of the sampling it was used as inclusion criterion the previous result obtained by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), having been selected 144 stool samples that presented inconclusive results by PAGE. The identification of groups A, B, and C rotaviruses was carried out by RT-PCR assays. To identify group A rotavirus were used consensus primers for G (VP7) type described by Gouveia et al. (1994) and Das et al. (1994), and P (VP4) type described by Gentsch et al. (1994). The group B rotavirus was identified by a semi-nested PCR assay describe by Gouveia et al. (1991) that amplified a 434 bp fragment from gene 8 (NSP2). The rotavirus group C was detected by RT-PCR amplification resulting in an amplicon of 270 bp from gene 5 (VP6) according Alfieri et al. (1999). In 144 stool samples analyzed, 103 (71.5%) were positive and 41 (28.5%) negatives for the tree rotavirus groups evaluated. Single infection were detected in 58 (40.3%) samples, where in 34 (23.6%) samples were identified the group A; in 19 (13.2%) samples the group B, and in 5 (3.5%) samples the group C rotavirus. In 45 (31.4%) stool samples were identified mixed infections with two and even three rotavirus groups. Groups B and C rotavirus were more frequent (42.4%) in mixed infection. The diagnosis rate of atypical rotavirus so in single as mixed infections was higher than described in other studies. The inclusion criteria and the use of RT-PCR assays for diagnosis contributed for this greater frequency of groups B and C rotaviruses that were sporadically related with piglets diarrhea. The high rate of atypical rotavirus diagnosis showed that, as well as the group A, also the groups B and C are thoroughly disseminated in the Brazilian porcine herds. These results suggest that the not identification of groups B and C rotaviruses in diarrheic suckling piglets is due much more to the use of diagnosis methods less sensitive than your low prevalence.

Keywords: Piglets. Diarrhea. Group A rotavirus. Atypical rotaviruses. RT-PCR.

Introdução

As diarreias que ocorrem em leitões no período do pré-desmame constituem-se em um dos principais problemas sanitários na suinocultura mundial e são responsáveis por perdas econômicas consideráveis (FU et al., 1989; WIELER et al., 2001). A diarreia neonatal dos leitões é considerada um problema multifatorial e também multietiológico, onde podem estar envolvidos fatores vinculados à falhas no manejo zootécnico-sanitário, além de diversos microrganismos como bactérias, protozoários e vírus (MELIN et al., 2004).

Os rotavírus são considerados uma das principais causas de diarreia em animais jovens de várias espécies de mamíferos e de algumas espécies aviárias em todo o mundo (KAPIKIAN et al., 2001). Rotavírus pertencem à família *Reoviridae* e caracterizam-se por apresentarem ácido nucléico RNA de fita dupla com 11 segmentos genômicos, capsídeo constituído por três camadas protéicas concêntricas e pela ausência de envelope lipoproteico (KAPIKIAN; CHANOCK, 1996).

Com base na principal proteína (VP6) do capsídeo intermediário, os rotavírus são classificados em sete grupos sorológicos distintos designados de A-G (HOSHIMO e KAPIKIAN, 1994). A grande maioria dos episódios de diarreia em mamíferos jovens é ocasionada pelo rotavírus grupo A. Devido à dificuldade no diagnóstico as diarreias ocasionadas pelos outros grupos de rotavírus são esporadicamente relatadas (GOUVEIA et al., 1991).

Com relação à etiologia viral o rotavírus grupo A é considerado um dos principais agentes etiológicos de diarreia em leitões lactentes em todo o mundo (ROSEN et al., 1984; SAIF et al., 1994). Medidas rigorosas de limpeza e desinfecção das instalações e também a vacinação das matrizes são condutas que podem ser utilizadas para o controle e profilaxia da infecção (BARREIROS et al., 2003).

O diagnóstico do rotavírus grupo A é facilitado pela disponibilidade comercial de métodos rápidos como o ELISA e látex-aglutinação. A técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE), seguida de coloração pela prata, por possibilitar a análise do perfil eletroforético dos 11 segmentos genômicos do vírus, também é uma técnica bastante utilizada para o diagnóstico do rotavírus grupo A, apesar da necessidade de maior demanda de tempo para a sua realização (HERRING et al., 1982; AL-YOUSIF et al., 2001; KANG et al., 2005).

A infecção por rotavírus classificados nos grupos B e C, ou rotavírus atípicos, também pode ser responsável por episódios de diarreia em leitões (SAIF et al., 1994). Porém, devido à dificuldade do diagnóstico por meio de técnicas utilizadas na rotina laboratorial, são raros os estudos que incluem a identificação dos rotavírus grupos B e C em episódios de diarreia no pré-desmame dos leitões.

Além da indisponibilidade de *kits* comerciais para o diagnóstico de rotavírus grupos B e C a identificação desses vírus é ainda prejudicada pela menor quantidade de partículas virais eliminadas durante o período agudo da infecção (CHANG et al., 1997). Com isso, técnicas com menor sensibilidade como a PAGE podem gerar resultados falso-negativos (BARMAN et al., 2006).

Também devido à presença de bandas com fraca intensidade de coloração e, principalmente, de bandas extras, a análise do perfil eletroforético, ou eletroferotipo, da amostra é dificultada, o que também ocasiona resultados inconclusivos na PAGE. Essas ocorrências geram dificuldades no diagnóstico, tornando raras as situações em que a identificação de rotavírus grupos B e C em fezes diarreicas de leitões, e mesmo de outros mamíferos, seja relatada (SAIF, 1990; BARMAN et al., 2006).

Evidências sorológicas indicam que a infecção por rotavírus grupos B e C em suínos é bastante freqüente e em animais adultos foram relatadas taxas de soroconversão entre 80% a 100% para o rotavírus grupo C (SAIF; JIANG, 1994; BROWN et al., 1987). A utilização de técnicas de diagnóstico com maior sensibilidade, como a RT-PCR, também mostrou que a infecção rotavírus grupos B e C, singular ou mista, em seres humanos e em animais por pode ser muito superior à freqüentemente relatada (BARMAN et al., 2006).

Considerando os prejuízos econômicos que as infecções pelos rotavírus ocasionam à suinocultura mundial, o pouco conhecimento sobre a epidemiologia das infecções ocasionadas por rotavírus atípicos em suínos, bem como, o potencial zoonótico das rotavíroses o objetivo desse estudo foi utilizar a reação em cadeia pela polimerase, precedida de transcrição reversa, (RT-PCR) para a identificação dos rotavírus grupos A, B e C em uma coleção de amostras fecais diarreicas de leitões, e com resultados inconclusivos em PAGE.

Material e Métodos

Amostras fecais e critério de inclusão

Como critério de inclusão das amostras de fezes de leitões avaliadas nesse estudo utilizou-se o resultado da técnica de PAGE realizada de acordo com Hering et al. (1982). Amostras com resultados inconclusivos em PAGE ($n=144$), onde foram observadas bandas de fraca intensidade, bandas extras e amostras com eletroferotipo indefinido, foram incluídas na amostragem. De um total de 588 amostras de fezes de leitões lactentes analisadas por PAGE em 155 (26,36%) amostras foi possível a identificação de rotavírus com perfil eletroforético definido, sendo 148 (25,17%) amostras classificadas no grupo A; 5 (0,85%) no grupo B; e 2 (0,34%) no grupo C. Das 433 (73,64%) amostras restantes 289 (49,14%) foram consideradas negativas e em 144 (24,49%) evidenciou-se a presença de bandas com fraca intensidade de coloração, com perfil de migração compatível com rotavírus, porém em número e posição que dificultaram a definição do grupo e que foram classificadas como de resultado inconclusivo em PAGE (Tabela 1). As 144 amostras fecais provenientes de leitões lactentes, com uma a quatro semanas de vida, selecionadas para esse estudo, foram colhidas no período de 06/2004 a 06/2006. Todas as granjas eram de ciclo completo, com bom nível de tecnificação, localizadas em quatro estados (Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná e Mato Grosso do Sul) de duas regiões geográficas (Sul e Centro-Oeste), consideradas as principais regiões produtoras de suíno do Brasil. No momento da colheita das amostras de fezes nenhuma das granjas avaliadas utilizava vacinação contra o rotavírus grupo A para a profilaxia das diarreias neonatais.

Extração do RNA

A partir de uma suspensão fecal a 20% (p/v) em tampão Tris/ Ca^{++} (50 mM Tris-HCl; 10 mM NaCl; 1,5 mM 2-mercaptoetanol; 3 mM CaCl_2) as amostras foram centrifugadas a 3000 x g por 15 min a 4°C. Alíquotas de 450 μL do sobrenadante foram tratadas com SDS, concentração final de 1%, e incubadas por 30 min a 56°C. A extração do

ácido nucléico foi realizada pela associação das técnicas do fenol / clorofórmio / álcool isoamílico (25:24:1) descrita por Sambrook et al (1989), e da sílica/isotiocianato de guanidina (BOOM et al, 1990), com modificações descritas por Alfieri et al. (2006) (anexo 3 página 81). O RNA foi eluído em 50 µL de água ultra-pura estéril, tratada com DEPC (Invitrogen Life Technologies, EUA) e utilizado para a RT-PCR.

Detecção de rotavírus grupos A, B e C

A detecção do grupo A de rotavírus foi realizada por meio da técnica RT-PCR com *primers* consensus para a amplificação de produtos com 876 pb do gene VP4 (P tipo), de acordo com Gentsch et al. (1992), e do fragmento de 1062 pb do gene VP7 (G tipo), segundo Gouveia et al. (1990). A identificação de rotavírus atípicos (B e C) foi realizada por meio de uma SN-PCR para a amplificação de um produto com 434 pb do gene 8 (NSP2) do grupo B (GOUVEIA et al., 1991) e de uma RT-PCR para a amplificação de um produto com 270 pb do gene 5 (VP6) do rotavírus grupo C de acordo com Alfieri et al. (1999). O quadro 1 apresenta as características dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados nesse estudo. Todas as amostras fecais foram analisadas pelos três sistemas de RT-PCR. Como controle positivo para o grupo A de rotavírus foi utilizada a estirpe viral OSU de rotavírus suíno amplificada em cultura de células MA104 (ESTES et al., 1979) (apêndice 3, páginas 93). Devido à dificuldade de adaptação de estirpes de rotavírus grupos B e C em cultivo celular foram utilizados como controle positivo dois extratos fecais que apresentaram eletroferotipo característico dos grupos B ou C, sem a presença de bandas extras, com forte intensidade de coloração em PAGE, e que pela RT-PCR apresentaram reações somente frente aos *primers* específicos de cada grupo (B ou C). A especificidade dos produtos amplificados das amostras incluídas como controles de rotavírus grupos B e C foi ainda confirmada por meio de reações de seqüenciamento, em ambos os sentidos (*forward / reverse*). Alíquotas de água MilliQ estéril foram incluídas em todas as reações como controle negativo.

Análise dos produtos amplificados

Alíquotas de 10 µL dos produtos das reações de RT-PCR (grupos A e C) e de SN-PCR (grupo B) foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 2%, contendo

brometo de etídeo (0,5 µg/mL), em tampão TBE pH 8,4 (89 mM Tris; 89 mM ácido bórico; 2 mM EDTA), sob voltagem constante (90 v) durante aproximadamente 30 min e visualizados sob luz UV. As imagens foram capturadas em sistema de fotodocumentação digital.

Seqüenciamento

A especificidade de três produtos amplificados nas reações para o grupo B e de nove para o grupo C foi avaliada por meio do seqüenciamento direto dos amplicons em ambos os sentidos (*forward / reverse*). Os produtos foram purificados utilizando os kits comerciais GFX PCR DNA e Band Purification (GE Healthcare, EUA) e, posteriormente, seqüenciados com o kit DYEnamic™ ET Dye Terminator (GE Healthcare, EUA), em seqüenciador automático MegaBACE™ 1000 (GE Healthcare, EUA). A qualidade das seqüências obtidas foi avaliada pelos *softwares* Phred/Phrap/Consed *Analysis Program* (<http://www.phrap.org/phredphrapconsed.html>) e a identidade dos produtos foi comparada com as seqüências depositadas em bases públicas de dados (GenBank – *National Institute of Health*, Bethesda, MD, EUA) utilizando o *software* BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Análise estatística

O teste do qui-quadrado (χ^2) com nível de significância a 5% foi utilizado para avaliar a diferenças nas taxas de diagnóstico dos rotavírus grupos B e C.

Resultados e Discussão

O diagnóstico do rotavírus por meio da técnica da RT-PCR, realizada em uma coleção de amostras de fezes, previamente analisada por PAGE e que pela dificuldade na interpretação dos resultados haviam sido caracterizadas como de resultados inconclusivos,

proporcionou a identificação de infecções singulares e mistas por rotavírus grupos A, B e C em leitões lactentes com diarreia. As taxas de diagnóstico para os três grupos de rotavírus suíno foram muito superiores às frequentemente relatadas.

A tabela 1 apresenta o resultado comparativo do diagnóstico de rotavírus grupos A, B e C obtido pela técnica de PAGE em uma coleção de amostras ($n=588$) de fezes de leitões lactentes e o obtido por meio da PCR em 144 amostras diarreicas com resultados inconclusivos em PAGE. A tabela 2 apresenta a distribuição dos grupos de rotavírus identificados de acordo com o tipo de infecção (singular / mista).

Os resultados observados no presente estudo, confirmam a PAGE como uma boa técnica de triagem, particularmente quando se está avaliando a presença de rotavírus grupo A. Entretanto, devido às características biológicas da infecção como o baixo número de partículas virais eliminadas no período agudo da infecção, as taxas de detecção dos grupos B e C de rotavírus podem ser subestimadas com o uso dessa técnica. O uso de SN-PCR para a identificação do grupo B e da RT-PCR para o grupo C proporcionou um incremento significativo ($P<0,05$) na frequência de diagnóstico desses dois grupos de rotavírus atípicos (Tabelas 1 e 2).

A utilização da PAGE para o diagnóstico de rotavírus grupos B e C em inquéritos epidemiológicos tem demonstrado frequência de amostras positivas em torno de 0,5 a 1% e 0,4%, respectivamente (SANEKATA et al., 1996; POGSUWANNA et al., 1999; KELKAR; ZADE, 2004). Nas análises dos resultados da PAGE é comum algumas amostras apresentarem bandas de fraca intensidade de coloração, bandas extras e em número e posição atípicos. Nessas amostras, nas quais o resultado foi considerado inconclusivo, foi possível a identificação dos grupos B e C de rotavírus e também do rotavírus grupo A, indicando que esse critério de inclusão incrementa a frequência do diagnóstico dos rotavírus. Das 144 amostras incluídas nessa situação e selecionadas para a análise por técnicas de amplificação molecular (RT-PCR e SN-PCR) apenas 41 (28,47%) amostras foram confirmadas como negativas. Nas 103 (71,53%) amostras restantes foi possível a identificação de rotavírus grupos A, B e C, tanto em infecções singulares quanto mistas.

Mesmo tendo sido utilizadas técnicas de SN-PCR e RT-PCR já descritas na literatura como específicas para rotavírus grupos B e C, respectivamente, devido à baixa frequência de ocorrência desses grupos de rotavírus suínos em estudos anteriores realizados no Brasil, alguns *amplicons* que geraram bandas com forte intensidade em gel de agarose foram selecionados para avaliar a especificidade do produto. As análises das seqüências de 12 produtos amplificados, três referentes ao rotavírus grupo B e nove ao grupo C, confirmaram

que os produtos amplificados eram específicos para os seus respectivos grupos (B ou C) de rotavírus.

Com relação à idade dos leitões lactentes incluídos nesse estudo não foi possível determinar a faixa etária de maior ocorrência nos diferentes grupos de rotavírus (tabela 3). Tanto infecções singulares quanto mistas por rotavírus dos grupos A, B e C ocorreram de forma homogênea em todas as faixas etárias.

Em suínos são relatadas frequências de rotavírus grupo B em torno de 0,5% (GOUVEIA et al., 1991; SANEKATA et al., 1996), na dependência da técnica de diagnóstico utilizada. Nesse estudo o rotavírus grupo B foi identificado em 19 (13,2%) amostras como o único grupo de rotavírus presente e em outras 33 (22,9%) amostras em infecções múltiplas com rotavírus grupos A ou C. Esses resultados demonstram que as infecções por rotavírus grupo B em leitões lactentes e com quadro clínico de diarreia é muito mais frequente do que a relatada e que a importância desse vírus no complexo diarreia neonatal dos leitões possa ser maior do que demonstram os inquéritos epidemiológicos realizados por meio da PAGE como técnica de diagnóstico.

Essa constatação observada com relação ao grupo B de rotavírus também aplica-se ao analisarmos as taxas de diagnóstico do rotavírus grupo C por meio da PAGE. Com frequência são relatadas taxas de positividade para o rotavírus grupo C em fezes de leitões em torno de 0,35% (PONGSUWANNA et al., 1996; SANEKATA et al., 1996). Entretanto, observamos nesse estudo que em 5 (3,5%) amostras de fezes diarreicas o rotavírus grupo C esteve presente em infecção singular, porém esse vírus foi identificado em associação aos grupos A e B em outras 28 (19,4%) amostras. A somatória desses percentuais (22,9%) também demonstra que a infecção de leitões pelo rotavírus grupo C é bem superior à descrita na literatura.

Apesar de trabalharem com uma amostragem ($n=34$) menor de fezes de leitões, também previamente analisadas por PAGE, Alfieri et al. (1999) obtiveram um acréscimo de 50% na taxa de detecção de rotavírus grupo C, tanto em infecções singulares quanto múltiplas, quando utilizaram a técnica da RT-PCR associada a probes de oligonucleotídeos marcados com digoxigenina. Esses resultados ratificam as evidências que a utilização de técnicas de diagnóstico mais sensíveis contribui substancialmente para a estimativa das taxas reais de infecção de suínos por rotavírus atípicos.

Em várias regiões do mundo (SAIF et al., 1994; MARTELLA et al., 2001; TEODOROFF et al., 2005) e também no Brasil (GATTI et al., 1989; ALFIERI et al., 1991; CALDERATO et al., 2001; BARREIROS et al., 2003) a importância do rotavírus grupo A na

etiologia dos episódios de diarreia em leitões lactentes e recém-desmamados é bem caracterizada. Devido a grande concentração de vírus excretada no período agudo da infecção, técnicas como ELISA, látex aglutinação e PAGE, consideradas de menor custo e complexidade para a sua elaboração, são rotineiramente utilizadas para o diagnóstico das infecções em seres humanos e animais (GOUVEIA et al., 1990).

A frequência de diagnóstico do rotavírus grupo A, em infecções isoladas e mistas, identificada na amostragem analisada nesse trabalho por meio da RT-PCR com *primers* consensuais para os genes VP7 e VP4 proporcionaram um incremento considerável na frequência de diagnóstico desse vírus (tabela 4). A frequência inicial de 25,2% de amostras positivas obtidas pela PAGE na coleção total de 588 amostras de fezes aumentou para 51,4% (74/144) ao considerarmos as amostras positivas para rotavírus grupo A identificadas pela RT-PCR na amostragem ($n=144$) selecionada para esse estudo. Das 74 amostras consideradas positivas pela RT-PCR 25 (33,8%), 5 (6,8%) e 44 (59,5%) foram positivas, respectivamente, somente para P, somente para G e simultaneamente para P e G tipos.

No grupo das 144 amostras com resultados inconclusivos em PAGE foi possível demonstrar ainda que tanto para o rotavírus grupo B quanto para o grupo C as infecções múltiplas com outros grupos de rotavírus, incluindo infecções até mesmo com os três grupos analisados, ocorreram com maior frequência do que as infecções singulares, ocasionadas por um único grupo de rotavírus. Martella et al. (2007) também demonstraram que as infecções por rotavírus grupo C em suínos, em associação com outros vírus como rotavírus grupo A e o calicivírus entérico suíno, foram mais frequentes que as infecções singulares. O efeito sinérgico entre vírus causadores de diarreia em animais jovens e mesmo entre vírus e outras classes de enteropatógenos, contribuindo com o aumento da intensidade de lesões intestinais e também o quadro clínico de diarreia, já foram relatados por outros autores (RUNNELS et al., 1986; CHANG et al., 1999).

Genótipos clássicos de rotavírus suíno grupo A tem sido descritos ocasionando infecções em crianças (CUBITT et al., 2000; STELLE; IVANOFF, 2003). Algumas evidências também suportam a hipótese do provável potencial zoonótico dos rotavírus grupos B e C de origem animal (TSUNEMITSU et al., 1992; ALAM et al., 2006; BARMAN et al., 2006). Assim como em animais, também em seres humanos, apenas em raras situações o diagnóstico dos rotavírus atípicos é incluído na rotina laboratorial das diarreias infantis. No presente estudo a utilização de técnicas moleculares com alta sensibilidade evidenciou a alta frequência das infecções por rotavírus grupos B e C em leitões lactentes com uma a quatro semanas de vida e com quadro clínico de diarreia. Esses

resultados geram a perspectiva do desenvolvimento de estudos moleculares mais abrangentes, com o objetivo de monitorar prováveis infecções heterólogas, ocasionadas por estirpes virais de origem animal e/ou humana que poderiam caracterizar o potencial zoonótico desses grupos de rotavírus atípicos.

O presente estudo, além de ratificar a importância do rotavírus grupo A na etiologia dos episódios de diarreia em leitões lactentes, também demonstrou a alta frequência de ocorrência das infecções ocasionadas pelo rotavírus grupos B e C. O percentual de amostras fecais positivas para esses grupos de rotavírus atípicos, encontrado em um número expressivo de rebanhos com manejo altamente tecnificado e em todos os quatro estados brasileiros incluídos na análise, caracterizou que, assim como ocorre com o rotavírus grupo A, os grupos B e C também podem apresentar caráter endêmico em nosso país. Observou-se ainda o predomínio das infecções mistas ocasionadas pelos rotavírus grupos B e C, tanto entre eles quanto em associação com o rotavírus grupo A, sobre as infecções singulares. Estudos complementares são necessários para melhor caracterizar esse tipo de associação, bem como o possível envolvimento de outros enteropatógenos que podem contribuir para o agravamento dos sinais clínicos. Esses resultados caracterizam a importância da inclusão dos rotavírus grupos B e C no diagnóstico das diarreias dos leitões com o objetivo de melhor caracterizar a epidemiologia da infecção, avaliar a real necessidade da implementação de medidas específicas de controle e profilaxia, bem como para o monitoramento do potencial zoonótico dessas infecções.

RV / Grupo	Gene	Primer	Seqüência	Nucleotídio	Produto (pb)	Referência
A	VP4	Con3	TGGCTTCGCTCATTATAGACA	11-32 (+)	876 pb	(1)
		Con2	ATTCGGACCATTATAACC	868-887 (-)		
	VP7	Beg9	GGCTTTAAAAGAGAGAATTTCCGTCTGG	1-28 (+)		(2)
		End9	GGTCACATCATACAATTCTAATCTAAG	1062-1036 (-)		(2)
		End9 (UK)	GGTCACATCATCAAACCTAATCT	1062-1039 (-)		(3)
CRW8	GGTCACATCTTACAGCTTTAACCT	1059-1036 (-)	1062 pb	(3)		
B	NSP2	B1	CTATTCAGTGTGTCGTGAGAGG	18-42 (+)	434 pb	(4)
		B3	CGAAGCGGGCTAGCTTGCTCTGC	451-473 (-)		
		B4	CGTGGCTTTGGAAAATTCITG	506-527 (-)		
C	VP6	BMJ41	GGCTTTAAAATTCATTCA	1-20 (+)	270 pb	(5)
		BMJ42	CCTCTAGTTGATTGAACATA	251-270 (-)		

Quadro 1 – Oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados para a detecção de rotavírus grupos A, B e C em fezes de leitões.

- (1) Gentsch et al., 1992
- (2) Gouveia et al., 1990
- (3) Das et al., 1994
- (4) Gouveia et al., 1991
- (5) Alfieri et al., 1999

Tabela 1 – Distribuição dos resultados do diagnóstico de rotavírus grupos A, B e C em amostras de fezes de leitões, de acordo com a técnica e a amostragem utilizada.

Resultado	Técnica utilizada (n° de amostras)	
	PAGE (n= 588)	PCR (n= 144)
Rotavírus grupo A	148	34
Rotavírus grupo B	5	19
Rotavírus grupo C	2	5
Inconclusivo	144	-
Infecção mista	-	45
Negativo	289	41

Tabela 2 – Distribuição dos resultados do diagnóstico do rotavírus grupos A, B e C em fezes diarréicas de leitões por RT-PCR, de acordo com o tipo de infecção.

Rotavirus / grupo	Tipo de infecção		Total
	Singular	Mista	
A ^a	34	40	74
B ^{a,b}	19	33	52
C ^b	5	28	33
Ttotal	58	101	159

($\chi^2=9,34$; $p=0,009$); ^a $=p>0,3$; ^b $=p<0,03$ (Mantel – Haenszel)

Tabela 3 – Distribuição do diagnóstico de rotavírus grupos A, B e C em infecções singulares e mistas identificados por RT-PCR em fezes diarréicas de leitões lactentes (n=144), de acordo com a faixa etária dos animais.

Tipo de Infecção	RV / Grupo	N° amostras positivas / faixa etária em semanas				Total
		Primeira	Segunda	Terceira	Quarta	
Singular	A	9	5	9	11	34
	B	8	6	2	3	19
	C	3	0	2	0	5
Mista	A+B	7	4	2	4	17
	A+C	5	1	2	4	12
	B+C	3	2	0	0	5
	A+B+C	2	1	3	5	11
Negativa	-	13	4	13	11	41

$p>0,05$

Tabela 4 – Distribuição dos resultados da RT-PCR com *primers* consensuais para a detecção dos genes VP4 e VP7 do rotavírus grupo A em fezes ($n=144$) de leitões com diarreia.

Consensual P/G tipos	Nº de Amostras
Somente VP4 (P)	25
Somente VP7(G)	5
VP4 e VP7	44
Negativas	70
Total	144

REFERÊNCIAS

- ALAM, M.M.; KOBAYASHI, N.; ISHIMO, M.; AHMED, M.S.; AHMED, M.U.; PAUL, S.K.; MUZUMDAR, B.K.; HUSSAIN, Z.; WANG, Y.H.; NAIK, T.N. Genetic analysis of a novel ADRV-N-like rotavirus strain B 219 detected in a sporadic case of adult diarrhea in Bangladesh. **Archives of Virology**, v.152, n.1, p.199-208, 2006.
- ALFIERI, A.A.; ALFIERI, A.F.; CONTE, L.E.; RESENDE, M. Evidências do envolvimento de rotavírus nas diarreias do pré e pós-desmame dos suínos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.43, p.291-300, 1991.
- 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.
- AL-YOUSIF, Y.; ANDERSON, J.; CHARD-BERGSTROM, C.; BUSTAMANTE, A.; MUENZENBERGER, M.; AUTIN, K.; KAPIL, S. Evaluation of a latex agglutination kit (virogen rotatest) for detection of bovine rotavirus in fecal samples. **Clinical Diagnosis Laboratory Immunology**, v.8, p.494-498, 2001.
- BARMAN, P.; GHOSH, S.; SAMAJDAR, S.; MITRA, U.; DUTTA, P.; BHATTACHARYA, S.K.; KOBAYASHI, N.; NAIK, T.N.; RT-PCR based diagnosis revealed importance of human group B rotavirus infection in childhood diarrhoea. **Journal of Clinical Virology**, v.36, p.222-227, 2006.
- BARREIROS, M.A.B.; ALFIERI, A.A.; ALFIERI, A.F.; MEDICI, 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.
- BOOM, R.; SOL, C.J.A.; SALIMANS, M.M.M.; JANSEN C.L.; WERTHEIM-VAN DILLEN, P.M.E.; NOORDAA-VAN DER, J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v.28, p.495-503, 1990.
- BROWN, D.W.; BEARDS, G.M.; CHEN, G.M.; FLEWETT, Y.H. Prevalence of antibody to group B (atypical) rotavirus in humans and animals. **Journal of Clinical Microbiology**, v.25, n.2, p.316-319, 1987.

CALDERARO, F.F.; BACCARO, M.R.; MORENO, A.M.; FERREIRA, A.J.P.; JEREZ, A.J.; PENA, H.J.F. Frequência de agentes causadores de enterites em leitões lactantes provenientes de sistemas de produção de suínos do Estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo**, v.68, n.1, p.29-34, 2001.

CHANG, K.O.; PARWAI, A.V.; SAIF, L.J. Detection of group B rotavirus 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.

CHANG, K.O.; NIELSEN, P.R.; WARD, L.A.; SAIF, L.J. Dual infection of gnotobiotic calves with bovine strains of group A and porcine like group C rotavirus influences pathogenesis of the group C rotavirus. **Journal of Virology**, v.73, p.9284-9293, 1999.

CUBITT, W.D.; STELLE, A.D.; ITURIZA, M. Characterization of rotavirus from children treated at a London hospital during 1996: emergence of strains G9P2A[6]. **Journal of Medical Virology**, v.61, p.150-154, 2000.

DAS, B.K.; GENTSCH, J.R.; CICIRELLO, H.G.; WOODS, P.A.; GUPTA, A.; RAMACHANDRAN, M.; KUMAR, R.; BHAN, M.K.; GLASS, R.I. Characterization of rotavirus strains from newborns in New Delhi, India. **Journal of Clinical Microbiology**, v.32, p.1820-1822, 1994.

ESTES, M.K.; GRAHAN, D.Y.; SMITH, E.M.; GERBA, C.P. Rotavirus stability and inactivation. **Journal of General Virology**, v.43, p.403-409, 1979.

FU, Z.P.; HAMPSON, D.J.; BLACKMORE, D.K. Detection and survival of group A rotavirus in a piggery. **Veterinary Records**, v.125, p. 576-578, 1989.

GATTI, M.S.V.; HARA, N.H.; FERRAZ, M.M.G.; PESTANA DE CASTRO, A.F. Presence of group A and non-A rotaviruses in neonatal piglets in Campinas, SP, Brazil. **Medical Microbiology and Immunology**, v.178, p.347-349, 1989.

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

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

GOUVEIA, V.; ALLEN, J.R.; GLASS, R.I.; FANG, Z.Y.; BREMONT, M.; COHEN, J.; McCRAE, M.A.; SAIF, L.J.; SINARACHATANANT, P.; CAUL, E.O. Detection of group B and C rotavirus by polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v.29, p.519-523, 1991.

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

HOSHIMO, Y.; KAPIKIAN, A.Z. Rotavirus antigens. **Current Topics Microbiology Immunology**, v.185, p.179-229, 1994.

ICTVdB – The Universal Virus Database, version 4. Disponível em: <<http://www.Ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/>>. Acesso em 15.jul.2007.

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, n.20, p.120-126, 2005.

KAPIKIAN, A.Z.; CHANOCK, R.M. Rotaviruses, In: Fields, B.N.; Knipe, M.; Chanock, R.M.; Hirsch, M.S.; Melnick, J.L.; Monath, T.P. Roizman, B. (Ed.). **Virology**, 2nd ed.; Philadelphia: Lippincott-Ravens, Philadelphia, 1996, p.1353-1404.

KAPIKAN, A.Z.; HOSHINO, Y.; CHANOCK, R.M. Rotaviruses. In KNIPE, D.M.; HOWLEY, M.; GRIFFIN, D.E.; LAMBRA, MARTIN M.A.; ROIZMAN B.; STRAUS, S.E. (Ed.). **Fields Virology**, 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams; Wilkins, Philadelphia : 2001, p.1787-1833.

KELKAR, S.D.; ZADE, J.K. Group B rotavirus similar to strain CAL-1 have circulating in Western India since 1991. **Epidemiology and Infection**, v. 132, p.745-749, 2004.

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

MARTELLA, V.; KRINSTIÁN, B.; ELEONORA, L.; LUCIA B.A.; INCOLA, D.; MICHELE, C.; GIANCARLO, B.; PASCHALINA, M.; SERENELLA, A.; GIOVANNI, P.; ANTONIO, L.; CANIO, B. Prevalence of group C rotavirus in weaning and post-weaning pigs with enteritis. **Veterinary Microbiology**, v.20, n.123, p.26-33, 2007.

MELIN, L.; MATTSSON, S.; KATOULI, M.; WALLGREN, P. Development of post-weaning diarrhoea in piglets. Relation to presence of *Escherichia coli* strain and rotavirus. **Journal of Veterinary Medicine B**, v.51, p.12-22, 2004.

PONGSUWANNA, Y.; TANIGUCHI, K.; CHIWAKUL, M.; URASAWA, T.; WAKASUGA, F.; JAYAVASU, C.; URASAWA, S. Serological and genomic characterization of porcine rotavirus in Thailand: detection of a G10 porcine rotavirus. **Journal of Clinical Microbiology**, v.34, p.1050-1057, 1999.

ROSEN, B.I.; PARWANI, A.V.; LOPEZ, S.; FLORES, J.; SAIF, L.J. Serotypic differentiation of rotavirus in fields samples from diarrheic pigs by using nucleic acid probes specific for porcine VP4 and human and porcine VP7 genes. **Journal of Clinical Microbiology**, v.32, p.311-317, 1984.

RUNNELS, P.L.; MOON, H.W.; MATTHEWS, P.J.; WHIPP, S.C.; WOODE, G.N. Effects of microbial and host variable on the interaction of rotavirus and Escherichia coli infections in gnotobiotic calves. **American Journal Veterinary Research**, v.47, p.1542-1550, 1986.

SAIF, L.J.; JIANG, B. Nongroup A Rotaviruses of Humans and Animals. **Current Topics in Microbiological Immunology**, v.185, p.339-371, 1994.

SAIF, L.J.; ROSEN, B.I.; PARWANI, A.V. Animal rotaviruses. In: KAPIAKAN, A.Z.(Ed.). **Viral Infecciones of the gastrointestinal tract**. 2nd ed.: New York, CRC Press, Boca Raton, New York: 1994. p.279-367.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. In: SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual** 2nd ed.: 1989, New York, Cold Spring Laboratoru Press, New York, 1989.

SANEKATA, T.; KUWAMOTO, Y.; AKAMATSU, Y.; 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.759-761, 1996.

STELLE, A.D.; IVANOFF, B. Rotavirus strains circulating in Africa during 1996-1999 : emergence of a G9 strain and P[6] strain. **Vaccine**, v.21, p.361-367, 2003.

TEODOROFF, T.A.; TSUNEMITSU, H.; OKAMOTO, K.; KATSUDA, K.; KOHMOTO, M.; KAWASHIMA, K.; NAKAGOMI, T.; NAKAGOMI, O. Predominance of porcine rotavirus G9 in Japanese piglets with diarrhea: close relationship of their VP7 genes with those of recent human G9 strain. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, n.3, p.1377-1384, 2005.

TSUNEMITSU H.; JIANG B.M.; SAIF L.J. Detection of group C rotavirus antigens and antibodies in animals and humans by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. **Journal Clinical Microbiology** , v.30, p.2129-2134, 1992.

WIELER, L.H.; ILIEFF, A.; HERBST, W.; BAUER, .; VIELER, E.; BAUERFEIND, R.; FAILING, 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.

3.2 EVIDENCE OF VP6 GENE DIVERSITY IN BRAZILIAN STRAINS OF PORCINE GROUP C ROTAVIRUS

EVIDENCE OF VP6 GENE DIVERSITY IN BRAZILIAN STRAINS OF PORCINE GROUP C ROTAVIRUS

Abstract

Rotavirus infections are the main cause of viral diarrhea in young animals and children all over the world, being group A rotavirus well established as an important etiologic agent in pigs enteric disease. The group B rotavirus was described in humans, pigs, cattle, lambs, and rats, although, the epidemiology of the disease remains unclear. Group C rotavirus (GCR) was identified as a cause of enzootic diarrhea in neonates and older pigs and was also detected in fecal specimens from human, dog, ferret, and bovine. Serological studies indicate that the virus is circulating worldwide. The GCR are distinguished from other rotavirus groups by the VP6 (gene 5) characteristics but recently it was described that the VP6 was not conserved in all species showing genetic variation between porcine strains. GCR in Brazilian swine herds have been described, however, wild-type strains were not characterized yet. The present study, describes phylogenetic analysis of partial gene 5 from Brazilian GCR strains. Eleven suckling piglet stool samples were collected during 2004 to 2006, from different herds in four Brazilian States. Animals age ranged from 1 to 4 weeks, and the stool samples were diarrheic ($n=8$) or with normal consistency ($n=3$). Samples were evaluated by GCR RT-PCR using primers BMJ41 and BMJ42 designed based on VP6 gene. Nine sequences, from the eleven with the 270 bp amplicon, could be analyzed. The nucleotide identity (230 nt fragment) among Brazilian strains ranged from 81.3 to 94.3%. All sequences had higher similarity with the porcine prototype Cowden, and three strains had enough (91.3 to 93.9%) identity to be classified in the Cowden group. The other six Brazilian strains showed a large heterogeneity (84.3 to 87.3%) in nucleotides with the porcine prototype. In the dendrogram reconstruction, four clearly distinct clusters were formed, including one human, one bovine and two with porcine strains, one of these being formed exclusively by the six Brazilian strains described in this study. The heterogeneity of Brazilian porcine GCR strains was higher than expected, however in amino acid analysis not all Brazilian sequences were so divergent, because, despite of the low identity in nucleotides, they showed 100% similarity in amino acid with the Cowden strain being a consequence of several silent mutations. The strains organized in the new porcine cluster did not show aspects of year of collect, presence of diarrhea, age of the pig and State of herd origin in common. These facts strongly suggest that these heterogeneous strains also were widely spread in Brazilian pigs herds. This study showed the genetic polymorphism into VP6 gene of porcine GCR strains that will contribute to further molecular studies.

Keywords: Diarrhea. VP6 gene. Porcine group C rotavirus. Phylogenetic analysis.

Introduction

Rotavirus infections are the major cause of viral diarrhea in young animals and children all over the world (KAPIKIAN et al., 2001). The viruses belong to the *Reoviridae* family, and its genome consists of 11 segments of double-stranded RNA. Rotaviruses may be classified into seven groups (A to G) on the bases of distinct antigenicity, determined by VP6 (middle layer capsid protein), and electrophoretic patterns (PEDLEY et al., 1983; SNODGRASS et al., 1984).

Group A rotavirus (GAR) are a well established cause of diarrhea in pigs. The disease might be endemic or epidemic, resulting in serious economic losses, principally in weaning piglets. In addition to the VP6 classification, GAR may be classified into serotypes, based on VP4 (P) and VP7 (G) structural proteins of the outer shell, which induces production of antibodies with neutralizing activity (OFFIT; BLAVAT, 1986). The group B rotavirus (GBR) was described in humans only in China, India and Bangladesh and most of infections occurs in adults (HUNG et al., 1983; KRISHNAN et al., 1999; SANEKATA et al., 2003). The virus was also detected in pigs, cattle, lambs, and rats (SNODGRASS et al., 1984). Seroprevalence studies demonstrate that GBR are widespread in pig population, although the epidemiology of the disease is not well known yet (BROWN et al., 1987).

Group C rotaviruses (GCR) were first described in a diarrheic stool sample from a nursing pig, in 1980 (SAIF et al., 1980), being later identified as a cause of enzootic diarrhea in neonates and older pigs (MORIN et al., 1990; KIM et al., 1999). The virus was also detected in fecal specimens from human, dog, ferret, and bovine (RODGER et al., 1982; TORRES-MEDINA, 1987; TSUNEMITSU et al., 1991; OTTO et al., 1999). Previous study reported 59 to 100% seroprevalence against GCR in nursing, weaning and adult pigs, being the antibody titer higher in elder pigs (TERRETT et al., 1987). Serologic studies have indicated that the virus is circulating worldwide (BRIDGER and BROWN, 1985; NAGESHA et al., 1988; TSUNEMITSU et al., 1992).

Because the requirements of the GCR to serial propagation in tissue cultured, many attempts failed to replicate the virus, except for one porcine (Cowden), one bovine (Shintoku), and one human (Ehime 9301) strains (SAIF et al., 1988; TSUNEMITSU et al., 1991; SHINOZAKI et al., 1996).

In spite of what happens in GAR, there was no formal genotyping classification to GCR based on P and G types. However, sequences comparison suggests the

existence of genetic diversity into the group C of rotaviruses. Analyses revealed that the Cowden, Shintoku, HF (porcine) and other human strains belong to different G serotypes each (TSUNEMITSU et al., 1991; JIANG et al., 1996). There was also a proposed classification based on P types, within porcine, bovine and human strains constituting three distinct groups (JIANG et al., 1999).

Since GCR are distinguished from other rotavirus groups essentially by the features of VP6, the molecular detection of this protein constitute a frequently target of diagnostic assays to the presence GCR in stool samples. VP6 is encoded by gene 5 of GCR and is highly immunogenic and antigenic, although it does not induce response of neutralizing antibodies (ESTES; COHEN, 1989; KAPIKIAN; HOSHINO; CHANOCK, 2001). Recently it was described an unexpected genetic variation of the VP6 gene among porcine strains (MARTELLA et al., 2007).

Previous relates have described high incidence of GCR infection in Brazilian swine herds, however, Brazilian wild-type strains have not been characterized yet (ALFIERI et al., 1999). The present study, describes molecular and phylogenetic analyses of partial gene 5 of GCR strains identified in Brazilian swine herds from distinct geographical regions.

Material and methods

1- Stool samples

Eleven piglet stool samples, collected between 2004 and 2006, from eleven different herds were evaluated to the presence of rotavirus. The samples were obtained from four Brazilian states: Mato Grosso do Sul (n=1); Parana (n=2); Santa Catarina (n=2) and Rio Grande do Sul (n=6) that are located in South and Center West geographical regions in Brazil. The samples were diarrheic, except three (one from SC and two from RS) that were with normal consistency. Animals age ranged from 1 to 4 weeks, being piglets still suckling.

2 - Detection of porcine group C rotavirus by RT-PCR

The RNA extraction was performed from 10% to 20% (w/v) of fecal suspensions in PBS with a combination of phenol/chloroform/isoamyl alcohol and silica/guanidinium isothiocyanate methods described by Alfieri et al. (2006). All samples were previously negative for GAR and GBR by PAGE and RT-PCR, respectively (Hering et al., 1982; Gouveia et al., 1991). The RT-PCR was performed using the forward primer BMJ41 (5' GGC TTT AAA AAT CTC ATT CA 3', [nt] 1-20) and reverse BMJ42 (5' CCT CTA GTT GAT TGA ACA TA 3', [nt] 251-270) that amplify a 270 bp fragment of GCR gene 5 (VP6) (Alfieri, et al. 1999). Electrophoresis analysis was carried out using ethidium bromide stained 2% agarose gel, and visualized under UV light.

3- Purification and sequence analysis

The amplicons were purified using the GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare/UK) and quantified with Low DNA Mass Ladder (Invitrogen™ Life Technologies). The sequences were obtained with DYEnamic ET Dye Terminator Kit (GE Healthcare/UK) in MegaBACE 1000/automated 96 capillary DNA sequencer. Sequence was performed with the same primers of RT-PCR in both directions.

Sequences quality analysis was performed using Phred/Phrap/consed and CAP3 softwares (<http://www.phrap.org/phredphrapconsed.html>). Sequence similarity search was performed using BLAST software (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) and translation of obtained sequences in Gene Runner software version 3.05. Multiple alignment and identity matrix were performed in software BioEdit version 7.0.5.3. Phylogenetic tree building was generated using the neighbor-joining algorithm based on the Kimura 2-parameter by Mega package (version 3.1), with 1000 replicates bootstrapping (KIMURA, 1980). The sequences included in the study were acquired at the National Center for Biotechnology Information, USA (GenBank) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/>) (Table 1).

Results

All samples had an amplicon of 270 bp in the GCR RT-PCR assay. In order to confirm the RT-PCR results and to characterize the circulating strains from Brazil, the fragments were purified and sequenced.

The contig of nine Brazilian sequences could be analyzed, showing high similarity with published GCR strains, when BLAST analysis was performed. The other two samples had not enough quality to continue with the analysis. The multiple alignment of the Brazilian sequences and porcine, bovine, and human GAR, GBR and GCR strains resulted in a 230 bp fragment of gene 5 (VP6).

The identity of the Brazilian GCR strains and GAR and GBR published strains were 59.5 to 66.5% and 34.1 to 38%, respectively (data not shown), while the lower similarity of the Brazilian sequences and GCR prototypes occurs between Shintoku and BRA30-UEL (78.2%). All the nine sequences had higher nucleotide identity (84.3 to 93.9%) with the porcine prototype Cowden, although this identity was lower than the values found among human GCR strains, which varied from 96.9 to 100% (strains Bristol and Preston were identical) or between the two strains from the bovine group (98.2%). The nucleotide identity among Brazilian strains ranged from 81.3 to 94.3% (Table 2).

In the dendrogram reconstruction, four distinct clusters were formed and named Porcine I, Porcine II, Human and Bovine. The Porcine I group included two subclusters where BRA21-UEL, BRA22-UEL and BRA29-UEL sequences were grouped together but segregated from the Cowden and WD534tc (a bovine strain previously described with high similarity with the porcine prototype Cowden) subcluster. The other Brazilian sequences BRA23-UEL, BRA25-UEL, BRA26-UEL, BRA27-UEL, BRA28-UEL and BRA30-UEL formed the Porcine II cluster that did not include other GCR published strains. The Human and Bovine clusters included exclusively human and bovine strains, respectively (Fig.1).

The amino acid analysis revealed that all GCR strains, including the Brazilian sequences, had higher amino acid similarity values than nucleotides identity. The similarity among Brazilian sequences ranged from 94.7 to 100%, being also higher with the prototype Cowden (96 to 100%). The two bovine strains included in the analysis were 100% similar, while the human strains were 98.6 to 100%. The identity among heterologous strains ranged from 86.8 to 96%. Comparison among Brazilian GCR sequences and outgroup strains

(GAR and GBR) showed lower similarity than nucleotide analysis, especially with GBR strains where the values ranged from 13.9 to 15.9% (data not shown).

Discussion

In this study, nine partial gene 5 sequences, which encodes the VP6 protein, of porcine GCR Brazilian strains were analyzed. The strains were obtained from piglets fecal samples from different swine herds in four Brazilian States. The molecular analysis revealed that all strains were porcine GCR with higher identity with the porcine prototype Cowden, in contrast to the identity with human and bovine strains. Among the Brazilian strains the nucleotide identity was high, revealing the extent of gene 5 polymorphism in field isolates from Brazil. The nucleotide similarity of some Brazilian isolates to each other and to the Cowden strain revealed less identity values than the comparison of heterologous strains (Cowden versus humans and Cowden versus bovine). Previous molecular study was performed in the gene 5 of GCR, and in spite of the fragment of gene 5 analyzed was different, the divergence in the nucleotide sequence were also described (MARTELLA et al., 2007).

In the phylogenetic tree, three Brazilian strains were placed in the same cluster of the porcine prototype Cowden (Porcine I cluster), although they clearly formed a distinct subcluster. These results are in accordance with Martella et al. (2007) study that also demonstrates the high genetic heterogeneity of porcine GCR VP6 gene (when compared with human and bovine groups), detecting Cowden-like strains that were grouped in a common branch with the prototype. The Porcine II cluster was formed exclusively by Brazilian sequences with low VP6 gene identity with other GCR strains indicating that the genetic variability is higher than already described. The six Brazilian strains from the Porcine I cluster did not show aspects related to the year of collect, presence of diarrhea, age of the pig and geographic origin of pig herds. These facts strongly suggest that these heterogeneous strains also were wide spread in Brazilian swine herds.

In amino acid analysis, two Brazilian sequences that, in nucleotide analysis, were grouped in the Porcine I cluster were actually identical to the Cowden and BRA29-UEL strains, being this divergence a consequence of several synonymous mutations. These mutations also occur among the porcine Brazilian sequences described in the study,

suggesting that silent mutation were common among GCR porcine strains, and concluding that amino acid and nucleotide analysis must be performed in association.

In the present study, it was described a large heterogeneity in VP6 gene from porcine GCR than was supposed. Previous studies indicated that genetic similarity might occurs between strains of different host species, where porcine/bovine, and porcine/human strains demonstrated high homology (CHANG et al., 1999; GABBAY et al., 2006). With the description of more GCR sequences from different host species, the molecular features of VP6 from GCR will be more clearly defined. This description of the genetic variability in porcine strains increases the possibility of variation in gene 5 of GCR, supposed more conserved, contrasting the hypothesis that only GAR have high variability (RAHMAN et al., 2005). Furthermore, the Brazilian divergent strains were detected in different herds at different periods, which suggest that the variability of wild-type strains may occurs frequently and are widely spread in Brazilian pig herds.

REFERENCES

- 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.
- BRIDGER, J.C.; BROWN, J.F. Prevalence of antibody to typical and atypical rotaviruses in pigs. **The Veterinary Record**, v.116, n.2, p.50, 1985.
- BROWN, D.W.G.; BEARDS, G.M.; GUANG-MU, C.; FLEWETT, T.H. Prevalence of Antibody to Group B (Atypical) Rotavirus in Humans and Animals. **Journal of Clinical Microbiology**, v.25, n.2, p.316-319, 1987.
- CHANG, K.O.; NIELSEN, P.R.; WARD, L.A.; SAIF, L.J. Dual Infection of Gnotobiotic Calves with Bovine Strains of Group A and Porcine-Like Group C Rotaviruses Influences Pathogenesis of the Group C Rotavirus. **Journal of Virology**, v.73, n.11, p.9284-9293, 1999.
- ESTES, M.K.; COHEN, J. Rotavirus Gene Structure and Function. **Microbiological Reviews**, v.53, n.4, p.410-449, 1989.
- GABBAY, Y.B.; BORGES, A.A.; BARARDI, C.R.M.; LINHARES, A.C.; MASCARENHAS, J.D.P.; SIMOE, J.D.P.; GLASS, R.I.; JIANG, B. Excretion profiles of porcine and human group C rotaviruses in children from Belém, Pará Brazil: evidence for interspecies transmission and sequential infections. In: PROCEEDINGS OF THE 9TH DOUBLE STRANDED RNA VIRUSES MEETING, 9., 2006, Cape Town, South Africa, p.109.
- GOUVEA, V.; ALLEN, J.R.; GLASS, R.I.; FANG, Z.Y.; BREMONT, M.; COHEN, J.; McCRAE, M.A.; SAIF, L.J.; SINARACHATANANT, P.; CAUL, O. Detection of Group B and C Rotaviruses by Polymerase Chain Reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v.29, n.3, p.519-523, 1991.
- HERRING, A.J.; INGLIS, N.F.; OJEH, C.K.; SNODGRASS, D.R.; MENZIES, J.D. Rapid Diagnosis of Rotavirus Infection by Direct Detection of Viral Nucleic Acid in Silver-Stained Polyacrylamide Gels. **Journal of Clinical Microbiology**, v.16, n.3, p.473-477, 1982.

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**, v.2, p.1078-1079, 1983.

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, n.1, p.85-88, 1999.

JIANG, B.; TSUNEMITSU, H.; DENNEHY, P.H.; OISHI, I.; BROWN, D.; SCHNAGL, R.D.; OSETO, M.; FANG, Z.Y.; AVENDANO, L.F.; SAIF, L.J.; GLASS, R.I. Sequence conservation and expression of the gene encoding the outer capsid glycoprotein among human group C rotaviruses of global distribution. **Archives of Virology**, v.141, n.2, p.381-390, 1996.

KAPIKIAN, A.Z.; HOSHINO, Y.; CHANOCK, R.M. Rotaviruses. In: Fields, B. **Fields Virology**. 4.ed. USA: LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, 2001. cap.55.

KIM, Y.; CHANG, K.O.; STRAW, B.; SAIF, L.J. Characterization of Group C Rotaviruses Associated with Diarrhea Outbreaks in Feeder Pigs. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, n.5, p.1484-1488, 1999.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequence. **Journal of Molecular Evolution**, n.16, p.111-120, 1980.

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.

MARTELLA, V.; BÁNYAI, K.; LORUSSO, E.; BELLACICCO, A.L.; DECARO, N.; CAMERO, M.; BOZZO, G.; MOSCHIDOU, P.; ARISTA, S.; PEZZOTTI, G.; LAVAZZA, A.; BUONAVOGLIA, C. Prevalence of group C rotaviruses in weaning and post-weaning pigs with enteritis. **Veterinary Microbiology**, v.123, n.1-3, p.26-33, 2007.

MORIN, M.; MAGAR, R.; ROBINSON, Y. Porcine Group C Rotavirus as a Cause of Neonatal Diarrhea in a Quebec Swine Herd. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.54, p.385-389, 1990.

NAGESHA, H.S.; HUM, C.P.; BRIDGER, J.C.; HOLMES, I.H. Atypical rotaviruses in Australian pigs. **Archives of Virology**, v.102, n.1-2, p.91-98, 1988.

OFFIT, P.A.; BLAVAT, G. Identification of the Two Rotavirus Genes Determining Neutralization Specificities. **Journal of Virology**, v.57, n.1, p.376-378, 1986.

OTTO, P.; SCHULZE, P.; HERBST, W. Demonstration of group C rotaviruses in fecal samples of diarrheic dogs in Germany. **Archives of Virology**, v.144, n.12, p.2467-2473, 1999.

PEDLEY, S.; BRIDGER, J.C; BROWN, J.F.; McCRAE, M.A. Molecular Characterization of Rotaviruses with Distinct Group Antigens. **Journal of General Virology**, v.64, p.2093-2101, 1983.

RAHMAN, M.; BANIK, S.; FARUQUE, A.S.G.; TANIGUCHI, K.; SACK, D.A.; RANST, M.V.; AZIM, T. Detection and characterization of human group C rotaviruses in Bangladesh. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, n.9, p.4460-4465, 2005.

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, n.4, p.724-726, 1982.

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, n.1, p.105-111, 1980.

SAIF, L.J.; TERRETT, L.A.; MILLER, K.L.; CROSS, R.F. Serial Propagation of Porcine Group C Rotavirus (Pararotavirus) in a Continuous Cell Line and Characterization of the Passaged Virus. **Journal of Clinical Microbiology**, v.26, n.7, p.1277-1282, 1988.

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, n.5, p.2187-2190, 2003.

SHINOZAKI, K.; YAMANAKA, T.; TOKIEDA, M.; SHIRASAWA, H.; SIMIZU, B. Isolation and serial propagation of human group C rotaviruses in a cell line (CaCo-2). **Journal of Medical Virology**, v.48, n.1, p.48-52, 1996.

SNODGRASS, D.R.; HERRING, A.J.; CAMPBELL, I.; INGLIS, J.M.; HARGREAVES, F.D. Comparisson of Atypical Rotaviruses from Calves, Piglets, Lambs and Man. **Journal of General Virology**, v.65, p.909-914, 1984.

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, n.2, p.268-272, 1987.

TORRES-MEDINA, A. Isolation of an atypical rotavirus causing diarrhea in neonatal ferrets. **Laboratory Animal Science**, v.37, n.2, p.167-171, 1987.

TSUNEMITSU, H.; SAIF, L.J.; JIANG, B.; 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, n.11, p.2609-2613, 1991.

TSUNEMITSU, H.; JIANG, B.; YAMASHITA, Y.; OSETO, M.; USHIJIMA, H.; SAIF, L.S. Evidence of Serologic Diversity within Group C Rotaviruses. **Journal of Clinical Microbiology**, v.30, n.11, p.3009-3012, 1992.

Table 1 – Strains with available VP6 gene sequence used in the study and original host

Rotavirus Group	Strain	Original host	GenBank accession number
A	WA	Human	KO2086
	NCDV	Bovine	AF317127
	OSU	Porcine	AF317123
B	WH1	Human	AY5398
	Nemuro	Bovine	AB106542
C	Bristol	Human	X59843
	Modunagari	Human	AF325806
	Belem	Human	M94155
	Yamagata	Bovine	AB108680
	Shintoku	Bovine	AB108680
	WD534tc	Bovine	AF162434
	Cowden	Porcine	M94157

Table 2 – Identity matrix of partial gene 5 (VP6) sequence among Brazilian, porcine, bovine and human GCR strains. Nucleotide (230 nt) is showed in the upper half of the matrix and amino acid (76 aa) in the lower half.

Strain	BRA21	BRA22	BRA23	BRA25	BRA26	BRA27	BRA28	BRA29	BRA30	Cowden	WD534tc	Belém	Bristol	Moduganari	Yamagata	Shintoku
BRA21-UEL	ID	0,943	0,813	0,834	0,83	0,843	0,847	0,93	0,834	0,939	0,921	0,843	0,865	0,856	0,847	0,839
BRA22-UEL	0,973	ID	0,843	0,843	0,86	0,878	0,847	0,921	0,852	0,926	0,908	0,839	0,86	0,852	0,847	0,839
BRA23-UEL	0,96	0,96	ID	0,891	0,917	0,873	0,882	0,817	0,9	0,847	0,834	0,826	0,821	0,813	0,8	0,804
BRA25-UEL	0,947	0,96	0,96	ID	0,904	0,886	0,869	0,826	0,908	0,843	0,839	0,808	0,804	0,804	0,8	0,804
BRA26-UEL	0,986	0,986	0,973	0,96	ID	0,895	0,878	0,83	0,921	0,856	0,843	0,83	0,826	0,817	0,8	0,795
BRA27-UEL	0,947	0,973	0,96	0,96	0,96	ID	0,873	0,843	0,895	0,852	0,839	0,791	0,813	0,795	0,821	0,817
BRA28-UEL	0,986	0,986	0,973	0,96	1	0,96	ID	0,839	0,895	0,873	0,856	0,839	0,834	0,821	0,813	0,808
BRA29-UEL	0,986	0,986	0,973	0,96	1	0,96	1	ID	0,834	0,913	0,895	0,843	0,865	0,856	0,83	0,83
BRA30-UEL	0,973	0,973	0,986	0,973	0,986	0,973	0,986	0,986	ID	0,869	0,856	0,817	0,821	0,813	0,786	0,782
Cowden	0,986	0,986	0,973	0,96	1	0,96	1	1	0,986	ID	0,982	0,869	0,882	0,865	0,839	0,83
WD534tc	0,986	0,986	0,973	0,96	1	0,96	1	1	0,986	1	ID	0,86	0,873	0,856	0,821	0,813
Belém	0,947	0,947	0,96	0,921	0,96	0,921	0,96	0,96	0,947	0,96	0,96	ID	0,969	0,973	0,808	0,808
Bristol	0,947	0,947	0,96	0,921	0,96	0,921	0,96	0,96	0,947	0,96	0,96	1	ID	0,969	0,808	0,808
Moduganari	0,934	0,934	0,947	0,907	0,947	0,907	0,947	0,947	0,934	0,947	0,947	0,986	0,986	ID	0,808	0,808
Yamagata	0,907	0,921	0,921	0,921	0,921	0,921	0,921	0,921	0,934	0,921	0,921	0,881	0,881	0,868	ID	0,982
Shintoku	0,907	0,921	0,921	0,921	0,921	0,921	0,921	0,921	0,934	0,921	0,921	0,881	0,881	0,868	1	ID

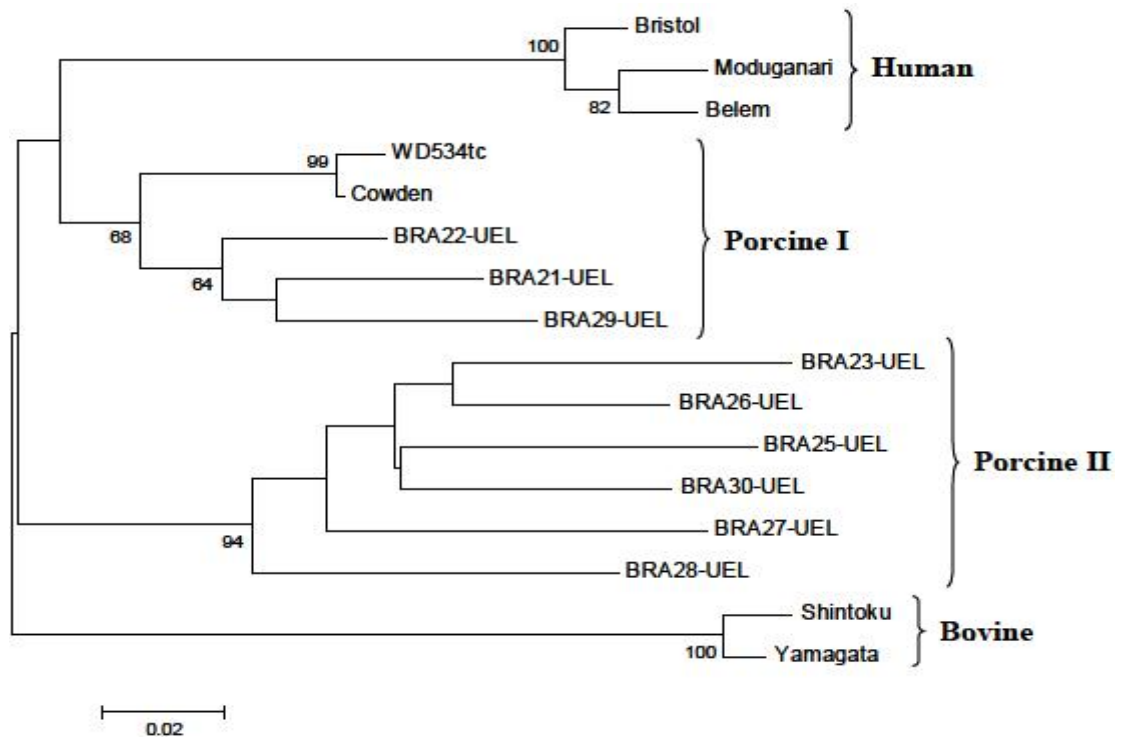


Figure1 – Phylogenetic tree reconstructed by neighbor-joining method (Kimura 2-parameter) and 1000 replicates among human, porcine, bovine and Brazilian strains of GCR based on partial (230 nt) VP6 gene. Sequences used in the alignment were acquired from GenBank as follows accession numbers: Bristol (X59843), Moduganari (AF325806), Belém (M94155), WD534tc (AF162434), Cowden (M94157), BRA22-UEL (EU002779), BRA21-UEL (EU002778), BRA29-UEL (EU002785), BRA23-UEL (EU002780), BRA26-UEL (EU002782), BRA25-UEL (EU002781), BRA30-UEL (EU002786), BRA27-UEL (EU002783), BRA28-UEL (EU002784), Shintoku (M 88768) and Yamagata (AB 108680).

3.3 PHYLOGENETIC ANALYSIS OF PORCINE GROUP B ROTAVIRUS NSP2 GENE

Abstract

Group B rotaviruses (GBR) were first identified in piglet feces, being later associated with diarrhea in humans, cattle, lambs, and rats. In humans, the virus was only described in China, India and Bangladesh infecting especially adults. After the first description of GBR from swine in 1980, other studies showed the presence of the virus in feces from pigs. Serological studies in United Kingdom, demonstrated 97% of antibody prevalence in pigs tested by ELISA, revealing that porcine GBR are widespread. The NSP2 is a conserved basic protein important in viral packaged and genomic replication. A few studies relative to molecular analysis of GBR NSP2 gene were conducted and porcine GBR was not characterized yet. In the present study, three GBR strains from piglets stool samples, collected during 2005 year from Paraná and Santa Catarina Brazilian States, were used for the analysis of GBR NSP2 gene. RT-PCR was performed with primers B1/B4 followed by semi-nested with B1/B3 designed by Gouvea et al. (1991) to amplify partial NSP2 gene (segment 8). The amplicons were purified and sequenced in both directions. The three samples had inconclusive electropherotypes patterns in PAGE but the 434 bp amplicon of GBR was obtained in semi-nested RT-PCR. All strains demonstrated higher similarity with human WH1 strain and the alignments with other published sequences resulted in three groups of strains divided according host species. The group composed by human strains, showed nucleotides homology from 92.4 to 99.7%, while the porcine group formed by the Brazilian GBR strains, had between 90.1 and 91.8% of identity to each other. The similarity of the Brazilian strains with outer sequences consisted of group A and C rotaviruses were only 35.6 to 42.8%. In the phylogenetic tree, the strains were also separated according host species, and three distinct clusters were formed: one human, one of the only rat strain IDIR, and a distinct third cluster composed exclusively by the porcine Brazilian strains. This is the first study of porcine GBR NSP2 gene, contributing to the characterization of GBR.

Keywords: Porcine. NSP2 gene. Group B rotavirus. Phylogenetic analysis.

The group B rotaviruses (GBR) were first identified as causative agent of enteric disease in pigs (PEDLEY et al., 1983). They were also associated with severe gastroenteritis in humans, cattle, lambs, and rats (SNODGRASS et al., 1984). In spite of serological evidences that human GBR, named Adult Diarrhea Rotavirus (ADRV), were present in many countries, the virus has been detected only from China, India and Bangladesh, where most of the cases were from adults (HUNG et al., 1983; KRISHNAN et al., 1999; SANEKATA et al., 2003). After the first description of GBR from swine in 1980, other studies showed the presence of the virus in feces from pigs, including the first isolation of a porcine GBR in cell cultures (SAIF et al., 1980; JANKE et al., 1990; SANEKATA et al., 1996). Serological studies in United Kingdom, demonstrated 97% of antibody prevalence in pigs tested by ELISA, revealing that porcine GBR are widespread (BROWN et al., 1987).

The properties and functions of nonstructural protein 2 (NSP2 or NS35) of group A rotavirus have been already described. The NSP2 is a conserved basic protein expressed to high levels in infected cells. The protein is organized in octamers and has Mg^{2+} dependent NTPase activity, which provides energy necessary to direct the packaged of viral mRNA (TARAPOREWALA et al., 1999; JAYARAM et al., 2002). NSP2 also has helix-destabilizing (helicase-like) activity, being, in interaction with NSP5, necessary to genomic replication (AFRIKANNOVA et al., 1998; TARAPOREWALA et al., 2001; SILVESTRI et al., 2004).

A few studies relative to molecular analysis of NSP2 of GBR were conducted. Actually, the available published analyses were conflicting in the classification of human strains detected in China and India (SEN et al., 2001; JIANG et al., 2005).

Despite the low number of GBR sequences available, a primer pair designed by Gouvea et al. (1991), targeting the NSP2 gene, showed satisfactory results to detect human and animal GBR strains from fecal samples. The assay was a semi-nested PCR and might be used to GBR screening, since this non-structural protein was supposed conserved among GBR strains. The present study describes the phylogenetic analysis of porcine GBR NSP2 gene, detected in Brazil, with other GBR from human and rat available in public database.

Three GBR strains obtained from piglets stool samples, during the year of 2005, were used for the analysis. BRA12-UEL (GenBank accession number EF577257), BRA14-UEL (EF577258), and BRA16-UEL (EF577259) were collected from Paraná and Santa Catarina Brazilian States and three different herds. The samples were previously selected by silver-stained PAGE (HERRING et al., 1982). RNA extraction from fecal specimens were performed according Alfieri et al. (2006) and amplified by RT-PCR with

primers B1/B4 and semi-nested with B1/B3 (GOUVEA et al., 1991). The resulting fragment of semi-nested RT-PCR had 434 bp length and was referent to NSP2 gene (segment 8) of GBR. After, the amplicons were purified using the GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare/UK) and quantified with Low DNA Mass Ladder (Invitrogen™ Life Technologies). The sequences were obtained with DYEnamic ET Dye Terminator Kit (GE Healthcare/UK) in MegaBACE 1000 sequencer, being performed with the same primers of semi nested RT-PCR in both directions.

Sequences quality analysis was performed using Phred/Phrap/consed and CAP3 softwares (<http://www.phrap.org/phredphrapconsed.html>). Sequence similarity search was performed using BLAST software (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) and multiple alignment and identity matrix in software BioEdit version 7.0.5.3. Phylogenetic tree building was generated using the neighbor-joining algorithm based on the Kimura 2-parameter distance estimative method for nucleotide, providing statistical support with bootstrapping with 1000 replicates (KIMURA, 1980) by Mega package (version 3.1). The sequences included in the study were acquired at the National Center for Biotechnology Information, USA (GenBank) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/>).

BRA12-UEL, BRA14-UEL and BRA16-UEL had inconclusive electropherotypes patterns in PAGE analysis but the expected 434 bp length amplicon of GBR was verified in agarose gel of semi-nested RT-PCR. After, they were sequenced and demonstrated enough quality to proceed the analysis. When BLAST analysis was performed all Brazilian strains demonstrated higher similarity with WH1 human GBR strain, which was detected in an adult sporadic case of diarrhea in Wuhan Hubei, China in 2002. The analysis of the alignments with other published sequences generated a 356 nucleotides fragment from the partial NSP2 gene, and resulted in three groups of strains divided according host species: Porcine, Rat and Human. The major group, which was composed by the human strains, showed identity from 92.4 to 99.7% in nucleotides analysis. While the porcine group that included the Brazilian GBR strains, had between 90.1 and 91.8% of identity to each other. Sequence analysis of genes from human GBR strain (CAL-1, Bang373, WH-1) showed generally high sequence identity to that of ADRV, whereas identities with animal GBR strains were considerably lower (TSUNEMITSU et al., 2005). Despite the porcine sequences were from two Brazilian States situated in the same geographical area, the lower identity values among sequences indicate that the Brazilian porcine strains were more heterogeneous than the human strains, even in human isolates obtained in different countries as China and India (Table1). Whether this variability will be verified in samples from other countries must be

undertaken. When compared to outer strains as group A (human, simian and bovine) and C (human) rotaviruses, the Brazilian sequences demonstrated only 35.6 to 42.8% of nucleotide identity. This analysis could not be performed with group A and B rotavirus porcine strains since there were no available sequences of NSP2 gene in public database.

In the dendrogram reconstruction based on NSP2 gene of the human GBR strains were all placed in the same cluster, clearly segregated in Indian (CAL) and Chinese (ADRV and WH1) subclusters, that was separated from the one-strain group, formed by IDIR strain, and from BRA12-UEL, BRA14-UEL and BRA16-UEL cluster, which was a distinct third cluster composed exclusively by the porcine Brazilian strains. Into this group there was also a subdivision in two subclusters, one composed by strains from two weeks-old piglets with diarrhea, and the other by one strain from a one week-old piglet without diarrhea (Fig.1). The differentiation into distinct clusters by phylogenetic analysis suggests that GBR from different host are genetically distinguishable from each other. Although, the number of strains analyzed was limited to associate these results.

To our knowledge this is the first report relative to NSP2 gene and phylogenetic analysis of NSP2 gene from porcine GBR strains, and in this way any porcine strain was available to comparison. Until this moment, a few GBR molecular analyses were conducted even in other host species, which make the characterization based on phylogenetic analysis limited. These results elucidate and contribute to the characterization of porcine GBR, segregating the strains according to different host species. Further studies need to be done to characterize and classify the GBR circulating strains, including porcine strains from other countries in order to verify whether this genetic variability also occurs among strains from distinct geographical areas.

REFERENCES

AFRIKANOVA, I.; FABBRETTI, E.; MIOZZO, M.C.; BURRONE, O.R. Rotavirus NSP5 phosphorylation is up-regulated by interaction with NSP2. **Journal of General Virology**, v.79, p.2679-2686, 1998.

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.

BROWN, D.W.G.; BEARDS, G.M.; GUANG-MU, C.; FLEWETT, T.H. Prevalence of Antibody to Group B (Atypical) Rotavirus in Humans and Animals. **Journal of Clinical Microbiology**, v.25, n.2, p.316-319, 1987.

GOUVEA, V.; ALLEN, J.R.; GLASS, R.I.; FANG, Z.Y.; BREMONT, M.; COHEN, J.; McCRAE, M.A.; SAIF, L.J.; SINARACHATANANT, P.; CAUL, O. Detection of Group B and C Rotaviruses by Polymerase Chain Reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v.29, n.3, p.519-523, 1991.

HERRING, A.J.; INGLIS, N.F.; OJEH, C.K.; SNODGRASS, D.R.; MENZIES, J.D. Rapid Diagnosis of Rotavirus Infection by Direct Detection of Viral Nucleic Acid in Silver-Stained Polyacrylamide Gels. **Journal of Clinical Microbiology**, v.16, n.3, p.473-477, 1982.

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**, v.2, p.1078-1079, 1983.

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.

JAYARAM, H.; TARAPOREWALA, Z.F.; PATTON, J.T.; PRASAD, B.V. Rotavirus protein involved in genome replication and packaging exhibits a HIT-like fold. **Nature**, v.417, n.6886, p.311-315, 2002.

JIANG, B.; WANG, Y.; GLASS, R.I.; FANG, Z.Y. The evolution of human group B rotaviruses: Correction and an update. **Journal of Clinical Virology**, v.34, p.158-159, 2005.

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.

PEDLEY, S.; BRIDGER, J.C.; BROWN, J.F.; McCRAE, M.A. Molecular Characterization of Rotaviruses with Distinct Group Antigens. **Journal of General Virology**, v.64, p.2093-2101, 1983.

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, n.1, p.105-111, 1980.

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, n.5, p.2187-2190, 2003.

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, n.3, p.759-761, 1996.

SEN, A.; KOBAYASHI, N.; DAS, S.; KRISHNAN, T.; BHATTACHARYA, S.K.; NAIK, T.N. The evolution of human group B rotaviruses. **Lancet**, v.357, p.198-199, 2001.

SILVESTRI, L.S.; TARAPOREWALA, Z.F.; PATTON, J.T. Rotavirus Replication: Plus-Sense Templates for Double-Stranded RNA Synthesis Are Made in Viroplasms. **Journal of Virology**, v.78, n.14, p.7763-7774, 2004.

SNODGRASS, D.R.; HERRING, A.J.; CAMPBELL, I.; INGLIS, J.M.; HARGREAVES, F.D. Comparisson of Atypical Rotaviruses from Calves, Piglets, Lambs and Man. **Journal of General Virology**, v.65, p.909-914, 1984.

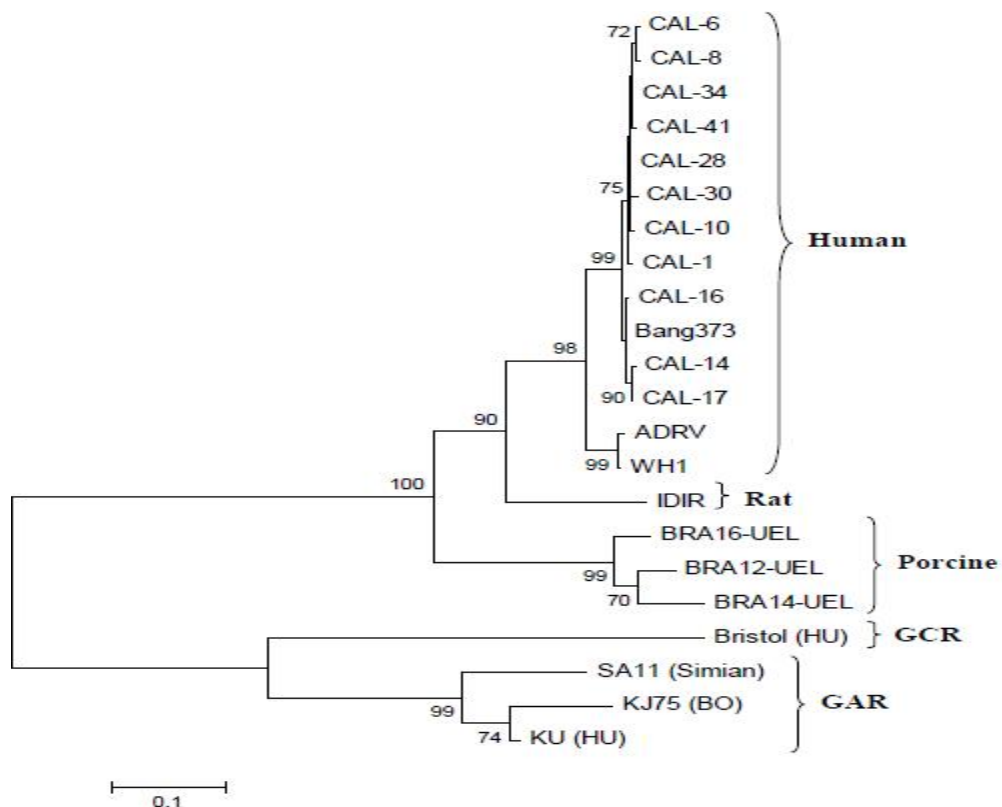
TARAPOREWALA, Z.F.; CHEN, D.; PATTON, J.T. Multimers Formed by the Rotavirus Nonstructural Protein NSP2 Bind to RNA and Have Nucleoside Triphosphatase Activity. **Journal of Virology**, v.73, n.12, p.9934-9943, 1999.

TARAPOREWALA, Z.F.; PATTON, J.T. Identification and Characterization of the Helix-Destabilizing Activity of Rotavirus Nonstructural Protein NSP2. **Journal of Virology**, v.75, n.10, p.4519-4527, 2001.

TSUNEMITSU, H.; KAMIYAMA, M.; KAWASHIMA, K.; KATSUDA, K.; KOHMOTO, M.; SAIF, L.J.; SHOUJI, T.; ONODERA, T. Molecular characterization of the major capsid protein VP6 of bovine group B rotavirus and its use in seroepidemiology. **Journal of General Virology**, v.86, p.2569-2575, 2005.

Table 1 – Nucleotide identity matrix (356 nt) of partial NSP2 gene, among Brazilian and published strains of group A, B and C rotavirus.

Strain	BRA12	BRA14	BRA16	CAL-1	CAL-6	CAL-8	CAL-14	CAL-17	CAL-30	CAL-41	ADRV	WH1	Bang373	IDIR	KJ75	SA11	KU	Bristol
BRA12/UEL	ID	0,918	0,901	0,703	0,7	0,697	0,703	0,705	0,691	0,7	0,722	0,728	0,705	0,705	0,414	0,405	0,428	0,39
BRA14/UEL	0,918	ID	0,915	0,691	0,686	0,686	0,686	0,689	0,68	0,686	0,7	0,705	0,694	0,691	0,406	0,394	0,417	0,356
BRA16/UEL	0,901	0,915	ID	0,725	0,725	0,722	0,719	0,722	0,719	0,725	0,736	0,742	0,728	0,7	0,398	0,38	0,42	0,377
CAL-1	0,703	0,691	0,725	ID	0,985	0,985	0,983	0,985	0,988	0,988	0,932	0,932	0,991	0,806	0,404	0,396	0,425	0,38
CAL-6	0,7	0,686	0,725	0,985	ID	0,994	0,974	0,977	0,985	0,991	0,924	0,924	0,983	0,806	0,409	0,401	0,43	0,388
CAL-8	0,697	0,686	0,722	0,985	0,994	ID	0,974	0,977	0,985	0,985	0,924	0,924	0,983	0,806	0,406	0,398	0,428	0,385
CAL-14	0,703	0,686	0,719	0,983	0,974	0,974	ID	0,997	0,977	0,977	0,929	0,929	0,991	0,803	0,406	0,401	0,43	0,385
CAL-17	0,705	0,689	0,722	0,985	0,977	0,977	0,997	ID	0,98	0,98	0,932	0,932	0,994	0,806	0,404	0,398	0,428	0,388
CAL-30	0,691	0,68	0,719	0,988	0,985	0,985	0,977	0,98	ID	0,988	0,927	0,927	0,985	0,806	0,406	0,401	0,43	0,388
CAL-41	0,7	0,686	0,725	0,988	0,991	0,985	0,977	0,98	0,988	ID	0,927	0,927	0,985	0,809	0,409	0,401	0,43	0,382
ADRV	0,722	0,7	0,736	0,932	0,924	0,924	0,929	0,932	0,927	0,927	ID	0,988	0,938	0,801	0,404	0,396	0,425	0,393
WH1	0,728	0,705	0,742	0,932	0,924	0,924	0,929	0,932	0,927	0,927	0,988	ID	0,938	0,801	0,406	0,398	0,428	0,396
Bang373	0,705	0,694	0,728	0,991	0,983	0,983	0,991	0,994	0,985	0,985	0,938	0,938	ID	0,806	0,406	0,401	0,43	0,388
IDIR	0,705	0,691	0,7	0,806	0,806	0,806	0,803	0,806	0,806	0,809	0,801	0,801	0,806	ID	0,409	0,412	0,422	0,385
KJ75	0,414	0,406	0,398	0,404	0,409	0,406	0,406	0,404	0,406	0,409	0,404	0,406	0,406	0,409	ID	0,794	0,907	0,554
SA11	0,405	0,394	0,38	0,396	0,401	0,398	0,401	0,398	0,401	0,401	0,396	0,398	0,401	0,412	0,794	ID	0,802	0,541
KU	0,428	0,417	0,42	0,425	0,43	0,428	0,43	0,428	0,43	0,43	0,425	0,428	0,43	0,422	0,907	0,802	ID	0,557
Bristol	0,39	0,356	0,377	0,38	0,388	0,385	0,385	0,388	0,388	0,382	0,393	0,396	0,388	0,385	0,554	0,541	0,557	ID

**Figure 1** – Dendrogram reconstruction among human [CAL-1 (AY238383), CAL-6 (AY941792), CAL-8 (AY864913), CAL-10 (AY864914), CAL-14 (AY941778), CAL-16 (AY941789), CAL-17 (AY941776), CAL-28 (AY941777), CAL-30 (AY941790), CAL-34 (AY941791), CAL-41 (AY941779), Bang373 (AY238393), ADRV (AJ867609), WH1 (AY212934)], rat [IDIR (U03558)], and Brazilian [BRA12-UEL (EF 577257), BRA14-UEL (EF 577258) and BRA16-UEL (EF 577259)] group B rotaviruses strains, based on partial (356 nt) NSP2 gene. Group A rotavirus strains were SA11 (DQ838615) and KU (AB022770), from human, and KJ75 (DQ494402) from bovine. The Bristol (AJ132205) strain (group C rotavirus) was from a human infection.

4 CONCLUSÕES

- A utilização da RT-PCR em uma coleção de amostras fecais de leitões, com resultados inconclusivos para rotavírus, possibilitou a identificação da presença de rotavírus grupos A, B e C em frequência superior à relatada na literatura;
- Os grupos B e C de rotavírus suíno ocorreram com maior frequência em infecções mistas, caracterizadas pela presença simultânea de dois e até três grupos de rotavírus avaliados;
- Estirpes de rotavírus suíno grupo C identificadas no Brasil mostraram variação molecular no gene 5 (VP6), formando dois grupos distintos. Em um grupo foram alocadas as estirpes brasileiras semelhantes ao padrão suíno (Cowden) e no outro foram incluídas estirpes distintas dos padrões suíno, bovino e humano disponíveis em bases públicas de dados.
- O seqüenciamento e análise filogenética de amplicons com 434 pb do gene NSP2 demonstrou que as estirpes de rotavírus grupo B, identificadas em uma mesma espécie animal, são altamente conservadas, porém foi observado um polimorfismo genético mais acentuado entre as estirpes de origem suína quando comparadas com estirpes de origem humana.

APÊNDICES

APÊNDICE 1 – Lista de reagentes

1. Solução 100 mM dNTP, 4 x 250 µL; 25 µmol cada (100 mM dATP Solution, 100 mM dCTP Solution, 100 mM dGTP Solution, 100 mM dTTP Solution) (Invitrogen™ Life Technologies EUA)
2. 10 x PCR-*buffer* (200 mM Tris-HCl, pH 8.4, 500 mM KCl) (Invitrogen™ Life Technologies EUA)
3. 123 bp DNA *Ladder* (Invitrogen Life Technologies EUA)
4. 2-Mercapto-ethanol (C₂H₆O₅) P.M. 78,13 (Fluka™)
5. 5 x RT-*buffer* (250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 15 mM MgCl₂, 375 mM KCl) (Invitrogen™ Life Technologies EUA)
6. Acetona, P.A. (CH₃COCH₃) P.M. 58,08 (Dinâmica®)
7. Ácido acético glacial, P.A. (CH₃COOH) P.M. 60,05 (Nuclear®)
8. Ácido bórico (H₃BO₃) P.M. 61,83 (Reagen®)
9. Ácido clorídrico (HCl) P.M. 36,46 (Reagen®)
10. Ácido etilenodiaminotetraácido Sal di-sódico – EDTA, P.A. (C₁₀H₁₄N₂O₈Na₂₂H₂O) P.M. 372,24 (Reagen®)
11. Agarose (Invitrogen Life Technologies™ EUA)
12. Álcool etílico absoluto (C₂H₂OH) P.M. 46,07 (Nuclear®)
13. Álcool isoamílico (CH₃)₂CHCH₂CH₂OH) P.M. 88,15 (Synth®)

14. Azul de bromofenol (SigmaTM EUA)
15. Bicarbonato de sódio P.A.(NaHCO₃) P.M. 84,01 (BiotecTM)
16. Brometo de etídeo (C₂₁H₂₀N₃Br) P.M. 394,3 (SigmaTM EUA)
17. Cloreto de potássio, P.A. (KCl) P.M. 74,56 (Reagen[®])
18. Cloreto de sódio, P.A. (NaCl) P.M. 58,45 (Reagen[®])
19. Clorofórmio, P.A. (CHCl₃) P.M. 119,38 (Dinâmica[®])
20. Dióxido de sílica (SiO₂) P.M. 60,08 (SigmaTM EUA)
21. Dodecilsulfato de sódio – Lauril Sulfato de Sódio – SDS (C₁₂H₂₅NaO₄S) P.M. 288,38 (Synth[®])
22. Dulbecco's Modified Eagle Media 17.7g/pkg (InvitrogenTM Life Technologies EUA)
23. Fosfato de sódio dibásico anidro (Na₂HPO₄) P.M. 141,96 (Synth[®])
24. Fosfato de sódio monobásico (NaH₂PO₄ H₂O) P.M. 137,99 (Reagen[®])
25. Fungizon[®] Anfotericina B (Bristol-Meyers Squibb[®] Brasil)
26. Gentamicin Reagent Solution (10 mg/mL), líquida (SigmaTM EUA)
27. Glicina, P.A. (Nuclear[®])
28. Glicose (Reagen[®])
29. Hidróxido de sódio, P.A. (NaOH) P.M. 40,0 (DinâmicaTM)
30. Hidroximetil amino metano – TRIS 99% P.M. 121,1 (Inlab[®])

31. Isoticianato de guanidina P.M. 118,16 (Invitrogen™ Life Technologies EUA)
32. Metanol, P.A. (CH₃OH) P.M. 32,04 (Allkimia®)
33. *Platinum* Taq DNA Polymerase recombinant 500 unidades (Invitrogen™ Life Technologies)
34. Sacarose, P.A. – sucrose (C₁₂H₂₂O₁₁) P.M. 342,3 (Reagen®)
35. Superscript™ II RNase H- Reverse transcriptase (Invitrogen™ Life Technologies EUA)
36. Soro fetal bovino (FBS) (Invitrogen™ Life Technologies EUA)
37. Tripsina 1:250 (Invitrogen™ Life Technologies EUA)

APÊNDICE 2 – Soluções e tampões**Salina de St. Groth pH 7,2**

8 g de cloreto de sódio (NaCl)

0,4 g de cloreto de potássio (KCl)

1,77 g de fosfato de sódio dibásico anidro ($\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

0,69 g fosfato de sódio monobásico anidro ($\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot \text{H}_2\text{O}$)

2 g de glicose

Água MilliQ autoclavada q.s.p. 1 L

Meio de cultura celular base

13,4 g de meio Dulbecco's Modified Eagle Medium

3,7 g de bicarbonato de sódio (NaHCO_3)

Água MilliQ autoclavada q.s.p 1 L

Meio de cultura para manutenção celular

100 mL de meio de cultura

8 mL de soro fetal bovino

1 mL de aminoácido não essencial

1 mL de glutamina

55 µg/mL de anfotericina B

2,5 µg/mL de gentamicina (80mg/mL)

Meio de cultura para inoculação viral

100 mL de meio de cultura

5 µL de tripsina para inoculação viral

55 µg/mL de anfotericina B

2,5 µg/mL de gentamicina (80 mg/mL)

Tripsina (Verseno) para a cultura celular 10x

40 g de cloreto de sódio (NaCl)

2 g de cloreto de potássio (KCl)

5 g glicose
1 g EDTA
2,5 g Tripsina (1:250)
2 mL de vermelho de fenol
Água MilliQ autoclavada q.s.p. 500 mL

Tripsina para inoculação viral

1 mg de tripsina 1:250
Água MilliQ q.s.p. 1 mL

Hidratação da sílica

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

Solução L6

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

Tampão de amostra para eletroforese em gel de agarose

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

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

0,2 mL azul de bromofenol 1%

6,0 mL SDS 10%

1 mL 2-mercaptoetanol

2,5 mL de TRIS-HCL 0,5M

6 g ureéia

Água MilliQ q.s.p. 20 mL

Tampão de corrida para eletroforese em gel de agarose - TEB (TRIS – Ácido Bórico – EDTA) 10x – pH 8,4

107,78 g TRIS (0,89 M)

55,03 g de ácido bórico (0,89 M)

7,45 g de EDTA (0,02 M)

Água bidestilada q.s.p. 1L

Tampão de corrida para PAGE

30 g TRIS (0,24 M)

14,4 g de ácido aminoacético (glicina) ($\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$) (0,19M)

Água MilliQ q.s.p. 1L

Tampão de estabilização para o rotavírus (TRIS/ Ca^{++}) 10 x – pH 7,2

12,12 g TRIS (0,89mM)

2,2 g cloreto de cálcio (1,5mM)

Água MilliQ autoclavada q.s.p. 1L

Fenol/clorofórmio-álcool isoamílico

25 mL fenol saturado

24 mL clorofórmio

1 mL álcool isoamílico

SDS 10%

5 g de dodecilsulfato de sódio – Lauril sulfato de sódio – SDS ($\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_4\text{S}$)

Água MilliQ autoclavada q.s.p. 50 mL

Lower TRIS pH 8,8 para PAGE

36,34 g TRIS (1,5M)

Água MilliQ q.s.p. 200 mL

Upper TRIS pH 6,8 para PAGE

12,12 g TRIS (0,5M)

Água MilliQ q.s.p. 200 mL

Solução Acrilamida / Bisacrilamida

1,3 g bisacrilamida

50 g acrilamida

Água MilliQ q.s.p. 100 mL

Solução fixadora para PAGE

30 mL álcool etílico absoluto

1,5 mL ácido acético

Água MilliQ q.s.p. 300 mL

Solução de prata para PAGE

0,55 g de nitrato de prata

Água MilliQ q.s.p. 300 mL

Solução reveladora para PAGE

9 g hidróxido de sódio

2,5 mL formaldeído

0,06 g borohidreto de sódio

Água MilliQ q.s.p. 300 mL

Solução stop da coloração para PAGE

15 mL ácido acético P.A.

Água MilliQ q.s.p. 300 mL

Solução conservadora para PAGE

15 mL álcool etílico P.A.

Água MilliQ q.s.p. 300 mL

Gel inferior (7,5%) da PAGE

5 mL Lower TRIS

3 mL acrilamida/Bisacrilamida

50 µL TEMED

0,56 mL persulfato de amônio 2%

11,44 mL água bidestilada

Gel superior (3,5%) da PAGE

2,5 mL Upper TRIS

0,7 mL acrilamida/bisacrilamida

50 µL TEMED

0,60 mL persulfato de amônio 2%

6,20 mL água bidestilada

Gel de agarose 2%

1 g agarose

50 mL de tampão TEB 1x

Diluição de dNTP

solução estoque - concentração 100mM - 100 µl de cada dNTP

solução uso – concentração 10 mM – 10 µl da solução estoque + 90 µl de água MilliQ autoclavada

Diluição dos oligonucleotídeos iniciadores (Primers)**Proteína VP4 (gene 4 - P tipo do rotavírus grupo A)**

Sense - 4 Con3 (GENTSCH et al., 1992)

Sequência -5' TGGCTTCGCTCATTTATAGACA 3'

Posição – nt. 11-32 (+)

Concentração – $56,3 \text{ nmol} \times 1000 = 56300 \text{ pmol}/200 = 281,5 \text{ µL}$

solução estoque: ressuspender em 281,5 µL de água MilliQ estéril para obter uma solução 10x (200 pmol)

solução de uso – diluir uma parte da solução estoque em nove partes de MilliQ estéril para obter uma solução 1 x (concentração final = 20 pmol)

Proteína VP4 (gene 4 - P tipo do rotavírus grupo A)

anti-sense - 4 Con2 (GENTSCH et al., 1992)

Seqüência – 5' ATTTCCGGACCATTATAACC 3'

Posição – nt. 868-887 (-)

Concentração – $50,2 \text{ nmol} \times 1000 = 50200 \text{ pmol}/200 = 251 \text{ }\mu\text{L}$

solução estoque: ressuspender em 251 μL de água MilliQ estéril para obter uma solução 10 x (200 pmol)

solução de uso – diluir uma parte da solução estoque em nove partes de MilliQ estéril para obter uma solução 1 x (concentração final = 20 pmol)

Proteína VP7 (gene 7 - G tipo do rotavírus grupo A)

Sense - Beg9 (GOUVEIA et al., 1990)

Seqüência - 5'GGCTTTAAAAGAGAGAATTTCCGTCTGG 3'

Posição – nt. 1-28 (+)

Concentração – $18,5 \text{ nmol} \times 1000 = 18500 \text{ pmol}/200 = 92,5 \text{ }\mu\text{L}$

solução estoque: ressuspender em 92,5 μL de água MilliQ estéril para obter uma solução 10 x (200 pmol)

solução de uso – diluir uma parte da solução estoque em nove partes de MilliQ estéril para obter uma solução 1 x (concentração final = 20 pmol)

Proteína VP7 (gene 7 - G tipo do rotavírus grupo A)

anti-sense - End9 (GOUVEIA et al., 1990)

Seqüência – 5' GGTCACATCATAACAATTCTAATCTAAG 3'

Posição – nt. 1062-1036 (-)

Concentração – $56,1 \text{ nmol} \times 1000 = 56100 \text{ pmol}/200 = 280,5 \text{ }\mu\text{L}$

solução estoque: ressuspender em 280,5 μL de água MilliQ estéril para obter uma solução 10x (200 pmol)

solução de uso – diluir uma parte da solução estoque em nove partes de MilliQ estéril para obter uma solução 1 x (concentração final = 20 pmol)

Proteína VP7 (gene 7 - G tipo do rotavírus grupo A)

anti-sense - End9 (UK) (DAS et al., 1994)

Seqüência – 5' GGTCACATCATCAAACCTAATCT 3'

Posição – nt. 1062-1039 (-)

Concentração – $37,2 \text{ nmol} \times 1000 = 37200 \text{ pmol}/200 = 186 \text{ }\mu\text{L}$

solução estoque: ressuspender em $186 \text{ }\mu\text{L}$ de água MilliQ estéril para obter uma solução 10 x (200 pmol)

solução de uso – diluir uma parte da solução estoque em nove partes de MilliQ estéril para obter uma solução 1 x (concentração final = 20 pmol)

Proteína VP7 (gene 7- G tipo do rotavírus grupo A)

anti-sense - CRW8 (DAS et al., 1994)

Seqüência – 5' GGTCACATCTTACAGCTTTAACCT 3'

Posição – nt. 1059-1036 (-)

Concentração – $49,7 \text{ nmol} \times 1000 = 24800 \text{ pmol}/200 = 248,5 \text{ }\mu\text{L}$

solução estoque: ressuspender em $248,5 \text{ }\mu\text{L}$ de água MilliQ estéril para obter uma solução 10x (200 pmol)

solução de uso – diluir uma parte da solução estoque em nove partes de MilliQ estéril para obter uma solução 1 x (concentração final = 20 pmol)

Proteína NSP2 (gene 8 do rotavírus grupo B)

Sense - B1 (GOUVEIA et al., 1991)

Seqüência – 5' CTATTCAGTGTGTCGTGAGAGG 3'

Posição – nt. 18-42 (+)

Concentração – $18,3 \text{ nmol} \times 1000 = 18300 \text{ pmol}/200 = 91,5 \text{ }\mu\text{L}$

solução estoque: ressuspender em $91,5 \text{ }\mu\text{L}$ de água MilliQ estéril para obter uma solução 10 x (200 pmol)

solução de uso – diluir uma parte da solução estoque em nove partes de MilliQ estéril para obter uma solução 1 x (concentração final = 20 pmol)

Proteína NSP2 (gene 8 do rotavírus grupo B)

anti-sense - B3 (GOUVEIA et al., 1991)

Seqüência – 5' CGAAGCGGGCTAGCTTGTCTGC 3'

Posição – nt. 451-473 (-)

Concentração – $24,7 \text{ nmol} \times 1000 = 24700 \text{ pmol}/200 = 123,5 \text{ }\mu\text{L}$

solução estoque: ressuspender em $123,5 \text{ }\mu\text{L}$ de água MilliQ estéril para obter uma solução 10x (200 pmol)

solução de uso – diluir uma parte da solução estoque em nove partes de MilliQ estéril para obter uma solução 1 x (concentração final = 20 pmol)

Proteína NSP2 (gene 8 do rotavírus grupo B)

anti-sense da semi-nested PCR - B4 (GOUVEIA et al., 1991)

Seqüência – 5' CGTGGCTTTGGAAAATTCTTG 3'

Posição – nt. 506-527 (-)

Concentração – $20,6 \text{ nmol} \times 1000 = 20600 \text{ pmol}/200 = 103 \text{ }\mu\text{L}$

solução estoque: ressuspender em 103 μL de água MilliQ estéril para obter uma solução 10 x (200 pmol)

solução de uso – diluir uma parte da solução estoque em nove partes de MilliQ estéril para obter uma solução 1 x (concentração final = 20 pmol)

Proteína VP6 (gene 5 do rotavírus grupo C)

Sense - BMJ41 (ALFIERI et al., 1999)

Seqüência – 5' GGCTTTAAAAATCTCATTCA 3'

Posição – nt. 1-20 (+)

Concentração – $17,26 \text{ nmol} \times 1000 = 17260 \text{ pmol}/200 = 86,3 \text{ }\mu\text{L}$

solução estoque: ressuspender em 86,3 μL de água MilliQ estéril para obter uma solução 10 x (200 pmol)

solução de uso – diluir uma parte da solução estoque em nove partes de MilliQ estéril para obter uma solução 1 x (concentração final = 20 pmol)

Proteína VP6 (gene 5 do rotavírus grupo C)

anti-sense - BMJ42 (ALFIERI et al., 1999)

Seqüência – 5' CCTCTAGTTGATTGAACATA 3'

Posição – nt. 251-270 (-)

Concentração – $18,08 \text{ nmol} \times 1000 = 18080 \text{ pmol}/200 = 90,4 \text{ }\mu\text{L}$

solução estoque: ressuspender em 90,4 μL de água MilliQ estéril para obter uma solução 10 x (200 pmol)

solução de uso – diluir uma parte da solução estoque em nove partes de MilliQ estéril para obter uma solução 1 x (concentração final = 20 pmol)

APÊNDICES 3 – Protocolo de técnicas

Suspensão fecal – Extração bruta

Pesar 1 g do material fecal em balança de precisão

Adicionar 9 mL de tampão TRIS/Ca⁺⁺

(para amostra líquidas estabelecer a proporção 1:2)

Homogeneizar

Calibrar os tubos

Centrifugar 3000 rpm/10 min

Recolher sobrenadante

Identificar e estocar a 4°C

Extração do RNA: Método associação das técnicas fenol/clorofórmio-álcool isoamílico e sílica/tiocianato de guanidina

Aliquotar 450 µL da suspensão fecal

Adicionar 50 µL de SDS 10 %

Homogeneizar em vórtex

Banho-maria 56 °C /15 min

Centrifugar 10.000 x g /30 s

Adicionar 500 µL de fenol/clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1)

Homogeneizar em vórtex

Banho-maria 56 °C /15 min

Centrifugar 10.000 x g /15 min

Recolher o sobrenadante em outro microtubo

Adicionar 500 µL da solução L6

Homogeneizar em vórtex

Agitar em temperatura ambiente /10 min

Centrifugar 10.000 x g /5 min

Adicionar 25 µL de sílica hidratada

Homogeneizar em vórtex

Agitar em temperatura ambiente /30 min

Desprezar o sobrenadante em solução contendo 10 M NaOH

Adicionar 500 µL de solução L2

Homogeneizar em vórtex
 Centrifugar 10.000 x g /30 s
 Desprezar o sobrenadante em solução contendo 10M NaOH
 Adicionar 500 µL de solução L2
 Homogeneizar em vórtex
 Centrifugar 10.000 x g /30 s
 Adicionar 500 µL de etanol 70% gelado
 Homogeneizar em vórtex
 Centrifugar 10.000 x g /30 s
 Adicionar 500 µL de etanol 70% gelado
 Homogeneizar em vórtex
 Centrifugar 10.000 x g /30 s
 Adicionar 1000 µL de acetona P.A. gelada
 Homogeneizar em vórtex
 Centrifugar 10.000 x g /30 s
 Secar o *pellet* em termo bloco à 60°C (aproximadamente 2 min)
 Adicionar 50 µL de água DEPEC
 Homogeneizar em vórtex
 Banhomaria 56°C/15 min
 Homogeneizar em vórtex
 Centrifugar 10.000 x g /30 s
 Recolher o sobrenadante em outro microtubo tipo “ependorf”
 Estocar à 4°C ou –20°C até a utilização

RT PCR para o rotavirus grupo A

Mix desnaturação

Mix desnaturação G tipo	Mix Desnaturação P tipo
Primer Beg 9 (20 pmol) – 1 µl Primer End 9 (20 pmol) – 1 µL Primer End 9 UK (20 pmol) – 1 µL Primer End 9 CRW (20 pmol) – 1 µL Água 1 µL	4 com 2 (20 pmol) – 1 µL 4 com 3 (20 pmol) – 1 µL Água 3 µL
	Volume final – 5 µL
Volume final – 5 µL	

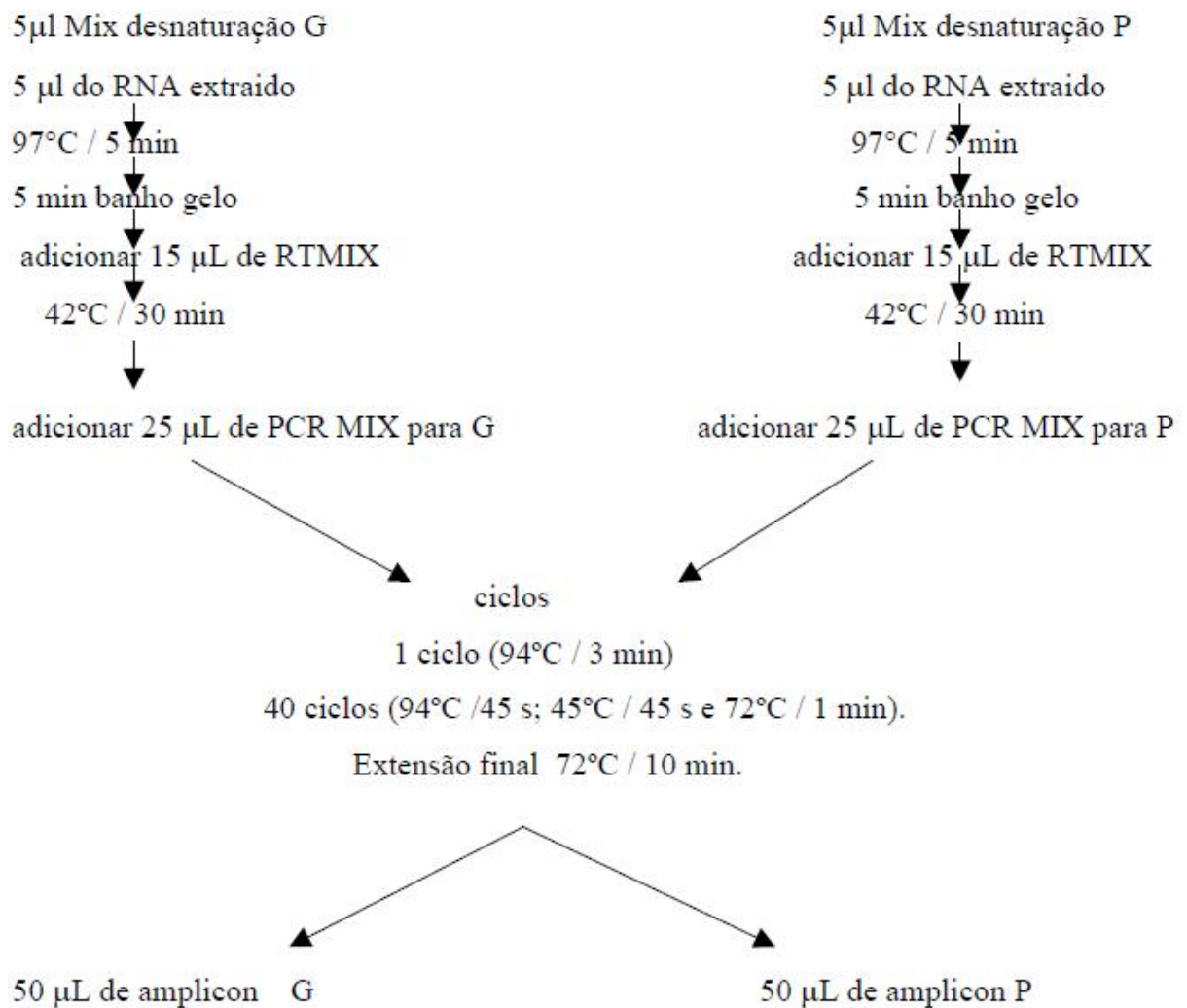
Mix Transcrição Reversa

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

Mix Reação da Polimerase em Cadeia (PCR)

Mix PCR G tipo (VP7)	Mix PCR P tipo (VP4)
Tampão 10 x pH 8,4 - 2,5 μ L	Tampão 10 x pH 8,4 - 2,5 μ L
dNTP 2,5 mM – 4 μ L	dNTP 2,5 mM - 4 μ L
<i>Platinun</i> ®Taq DNA Polymerase 5U/ μ L – 0,25 μ L	<i>Platinun</i> ®Taq DNA Polymerase 5U/ μ L – 0,25 μ L
Água 18,25 μ L	Primer4 com 2 (20 pmol) – 1 μ L
Volume final – 25 μ L	Primer 4 com 3 (20 pmol) – 1 μ L
	Água 16,25 μ L
	Volume final – 25 μ L

Esquema da RTPCR para G e P tipo de rotavírus grupo A



SNPCR para o rotavírus grupo B

Mix Desnaturação

Mix desnaturação
Primer B 1 (20 pmol) – 1 µL
Primer B 4 (20 pmol)– 1 µL
Água 3 µL
Volume final – 5 µl

Mix Transcrição Reversa

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

Mix Reação da Polimerase em Cadeia (PCR)

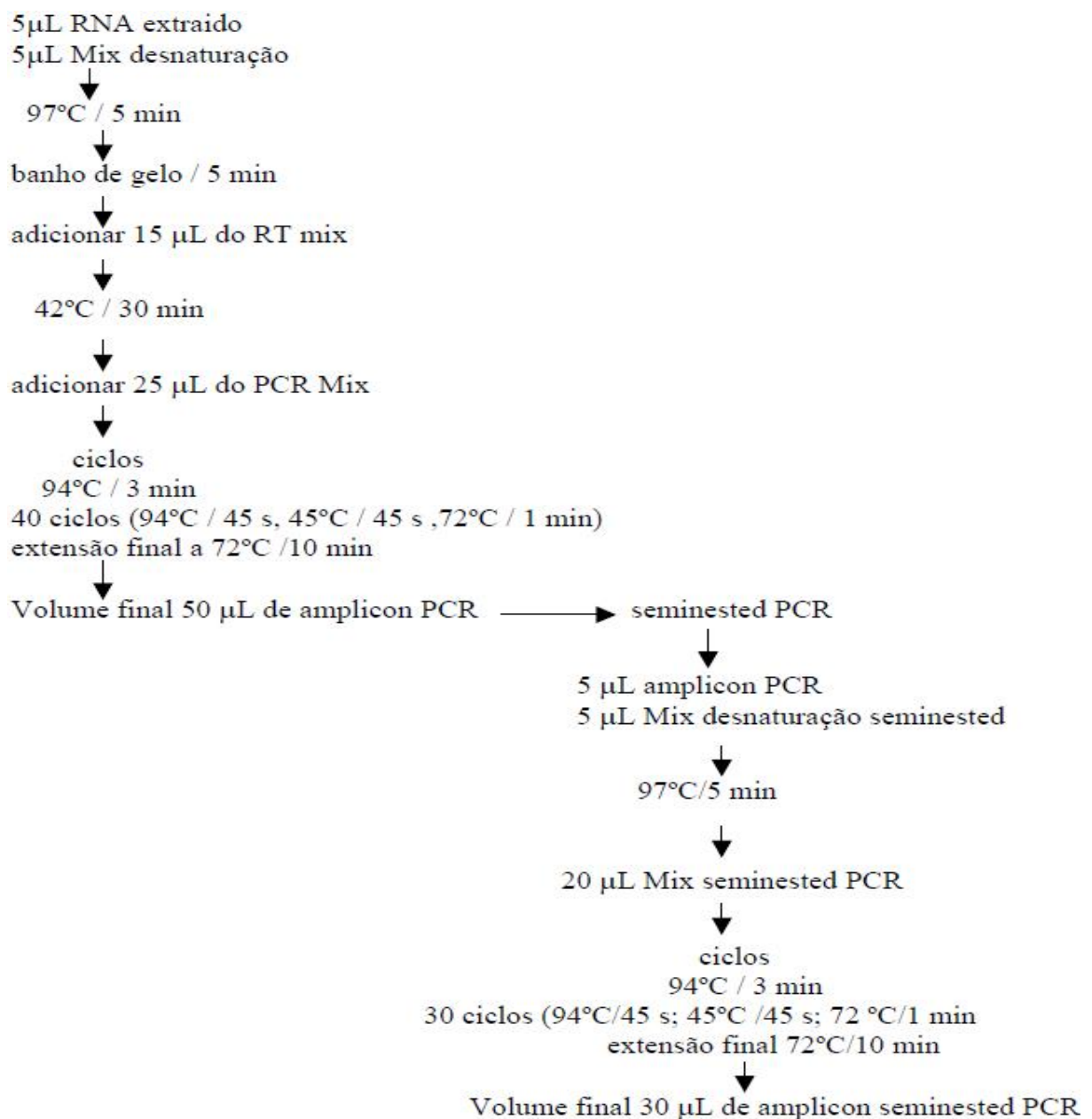
Mix PCR
Tampão 10 x pH8,4 – 2,5µL dNTP 2,5 mM – 4 µL Platinun®Taq DNA Polymerase 5 U/µL – 0,25 µL Água 18,25 µL
Volume final – 25 µl

Semi nested - PCR**Mix Desnaturação**

Mix desnaturação Nested
B 1 (20 pmol) – 1 µL B 3 (20 pmol) – 1µL Água 3 µL
Volume final – 5 µl

Mix Semi nested - PCR

Mix SemiNested – PCR
Tampão 10 x – 2,5µL
dNTP 2,5 mM – 4 µL
MgCl ₂ 50 mM – 2 µL
Platinun®Taq DNA Polymerase 5 U/µL – 0,25 µL
Água 11,25 µL
Volume final – 20 µL

Esquema da Semi nested-PCR para o rotavírus grupo B

PCR para o rotavírus grupo C**Mix Desnaturação**

Mix desnaturação
BMJ 41 (20 pmol) – 1 μ L
BMJ 42 920 pmol) – 1 μ L
Água 3 μ L
Volume – 5 μ L

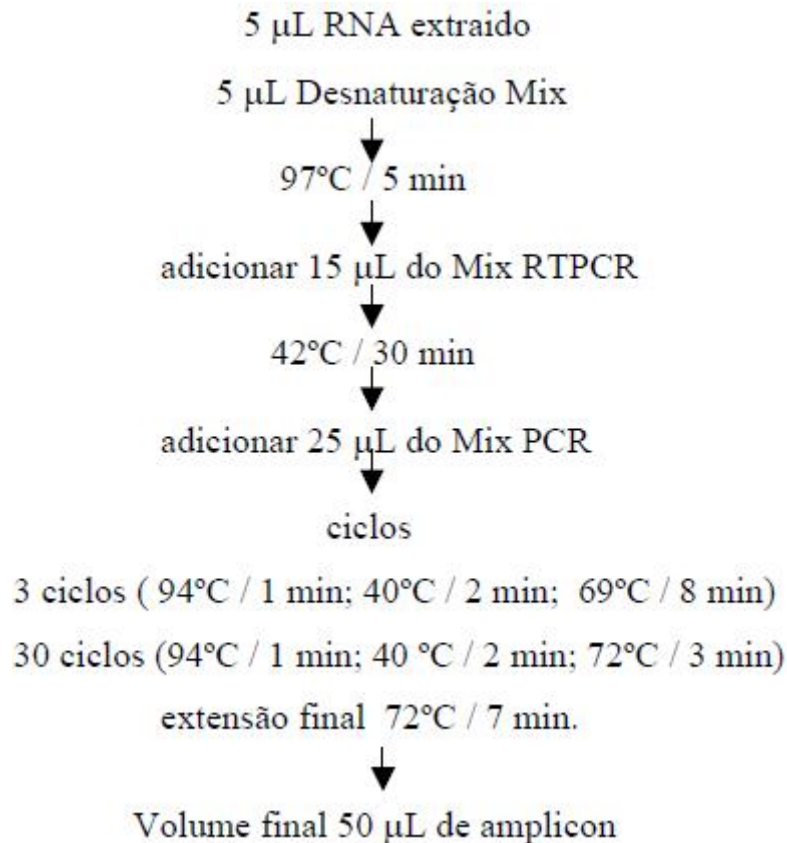
Transcrição Reversa

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

Reação da Polimerase em Cadeia (PCR)

Mix PCR
Tampão 10 x – 2,5 μ L
dNTP 2,5 mM – 4 μ L
Platinun®Taq DNA Polymerase 5U/ μ L – 0,25 μ L
Água 18,25 μ L
Volume – 25 μ L

Esquema para a PCR do rotavírus grupo C



Cultura de células MA 104 e Inoculação

Células MA 104 (Rhesus monkey kidney cells) mantidas em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium suplementado com 8 % de soro fetal bovino; 0,04 µg/mL de gentamicina e 0,025 µg/mL de anfotericina B, foram utilizadas para a propagação do rotavírus grupo A, utilizado como controle positivo nas reações de PAGE. Para a obtenção do inóculo, a estirpe padrão OSU foi previamente tratada com 10 µg tripsina (tripsina 1:250) por mL por 30 min à 37°C. Os tubos foram lavados duas vezes com solução salina de St. Groth e 500 µL do inóculo tratado foram inoculados em monocamada de células MA 104, cultivadas em tubo de rosca compatíveis com o sistema *roller*. Após adsorção por 1 h a 37°C, a cultura foi lavada uma vez com solução salina e foram adicionados 1,5 mL de meio para manutenção da célula com 5 µg tripsina. A cultura foi incubada em sistema *roller*, com observação diária da evolução do efeito citopático, por 3 dias ou até que 70% da monocamada apresentasse lise total, quando os tubos foram congelados para a lise das células. O inóculo resultante foi utilizado para subseqüentes inoculações e como controle nas reações de PAGE.

ANEXOS

ANEXO 1

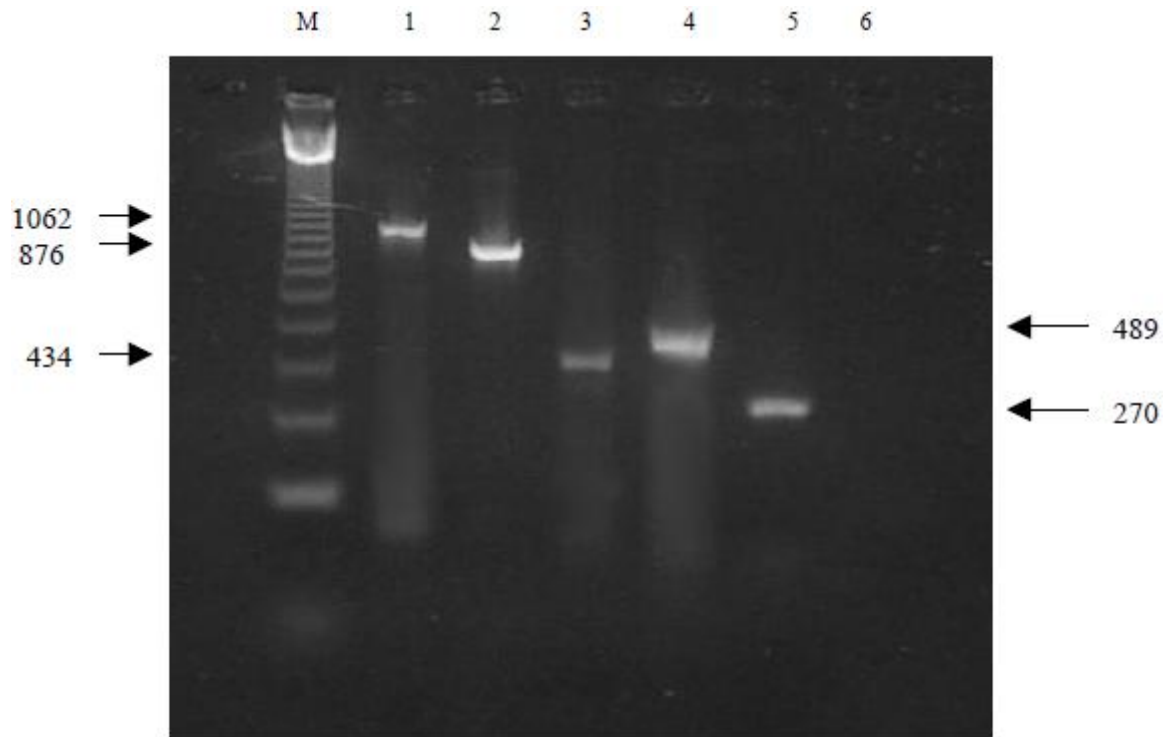


Figura 1 – RT-PCR e Semi-nested PCR para o rotavírus em amostras fecais de suínos provenientes de granjas brasileiras. Canaleta M: padrão de tamanho molecular 123 bp (InvitrogenTM Life Technologies, EUA); canaletas 1 e 2: produto amplificado da RT-PCR para G e P tipos do rotavírus grupo A; canaleta 3: produto amplificado da Semi-nested PCR para o rotavírus grupo B, canaleta 4: produto amplificado da RT-PCR para o rotavírus grupo B; canaleta 5: produto amplificado da RT-PCR para o rotavírus grupo C; canaleta 6: controle negativo.

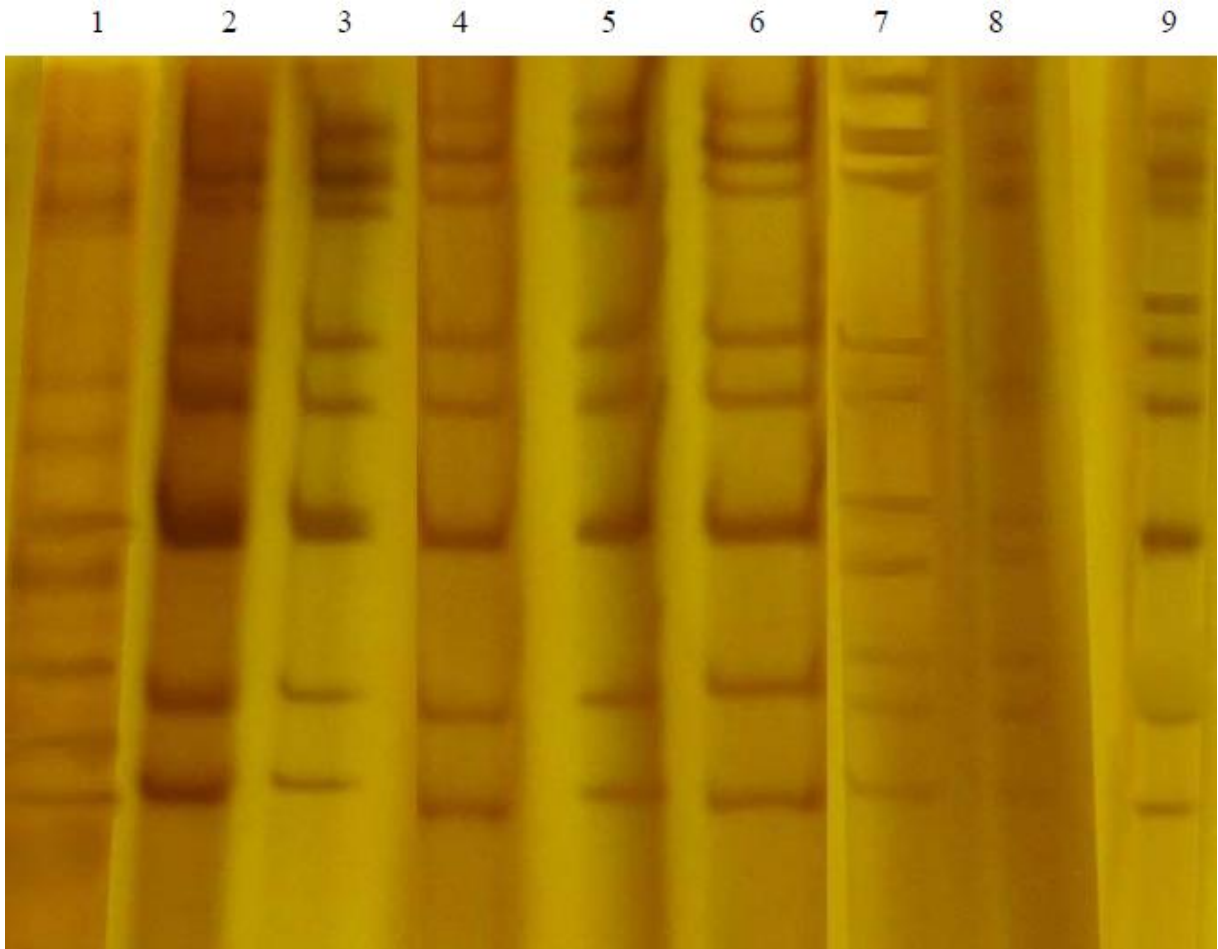


Figura 2 – Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) com os diferentes perfis de migração do RNA do rotavírus suíno encontrado em fezes de leitões. Canaleta 1: eletroferotipo atípico devido a presença de infecção mista com outros rotavírus; canaletas 2, 3, 4, 5, 6: eletroferotipos característicos de rotavírus grupo A; canaletas 7 e 8: eletroferotipos característicos de rotavírus grupo B; canaleta 9: eletroferotípo característico de rotavírus grupo C.