



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ELIS LORENZETTI

**ANÁLISE MOLECULAR DE CEPAS INCOMUNS DE
ROTAVÍRUS SUÍNO GRUPO A**

Londrina
2014

ELIS LORENZETTI

**ANÁLISE MOLECULAR DE CEPAS INCOMUNS DE
ROTAVÍRUS SUÍNO GRUPO A**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em
Ciência Animal – área de concentração Sanidade
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
2014

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

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

L869a Lorenzetti, Elis.

Análise molecular de cepas incomuns de rotavírus suíno grupo A / Elis Lorenzetti. – Londrina, 2014.
125 f. : il.

Orientador: Amauri Alcindo Alfieri.

Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2014. Inclui bibliografia.

1. Diarreia em suíno – Teses. 2. Suíno – Víroses – Teses. 3. Rotavírus – Teses. 4. Virologia molecular – Teses. 5. Filogenia – Teses. I. Alfieri, Amauri Alcindo. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

CDU 619:636.4

ELIS LORENZETTI

**ANÁLISE MOLECULAR DE CEPAS INCOMUNS DE ROTAVÍRUS
SUÍNO GRUPO A**

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

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Laurival Antônio Vilas Bôas
Universidade Estadual de Londrina - UEL

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

Prof.^a Dr.^a Michele Lunardi
Universidade de Cuiabá - UNIC

Prof. Dr. Selwyn Arlington Headley
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 21 de março de 2014.

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

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

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

DEDICATÓRIA

À Deus

Aos meus pais Ari Lorenzetti e Ilene Maria Delai Lorenzetti

Ao meu irmão Clécio Lorenzetti

Ao meu namorado Fábio Morotti

Aos meus afilhados Pedro Henrique Morotti Vendramini e Rafael Lorenzetti

AGRADECIMENTOS

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

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

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

Aos membros da banca de qualificação: Prof^a. Dr^a. Alice Fernandes Alfieri, Prof. Dr. João Luis Garcia e Prof. Dr. Selwyn Arlington Headley pelas importantes sugestões e contribuições. Aos membros da banca de defesa Prof^a. Dr^a. Michele Lunardi, Prof. Dr. Marco Antonio Bacellar Barreiros, Prof. Dr. Laurival Antônio Vilas Bôas e Prof. Dr. Selwyn Arlington Headley.

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

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de Doutorado.

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

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

À toda minha família, mas de modo especial aos meus pais (Ari e Ilene), pelo exemplo que são de honestidade, bondade, humildade, pelo carinho, pelo incentivo e principalmente por entenderem as minhas escolhas e compreenderem que a privação do convívio diário seria necessária para minha formação. Ao meu irmão (Clécio) pelos momentos inesquecíveis que vivemos e continuaremos vivendo juntos.

Aos meus afilhados Pedro Henrique Morotti Vendramini e Rafael Lorenzetti, pelo carinho e ensinamentos demonstrados em cada choro, gesto, fala e olhar.

Ao meu namorado Fábio Morotti, pela compreensão, carinho, amizade, companheirismo e apoio nas decisões mais difíceis durante esses 9 anos e meio de muito amor e cumplicidade. A toda sua família pelo carinho, amizade e hospitalidade.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Virologia Animal (mestrandos, doutorandos, residentes, estagiários e funcionários), pelas conversas, reflexões, convívio, amizade e auxílios que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

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

MUITO OBRIGADA.

Por isso não tema, pois estou com você;
não tenha medo, pois sou o seu Deus.
Eu o fortalecerei e o ajudarei;
eu o segurarei
com a minha mão direita vitoriosa.
Isaías 41:10

RESUMO

LORENZETTI, Elis. **Análise molecular de cepas incomuns de rotavírus suíno grupo A.** 2014. 126 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal, Área de Concentração: Sanidade Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2014.

RESUMO

A diarreia neonatal é um dos principais problemas sanitários que acomete leitões em todo o mundo. Em sistemas intensivos de produção o rotavírus suíno grupo A (RVA) é uma das principais etiologias de diarreia em leitões lactentes e recém-desmamados. A caracterização dos genótipos das cepas de RVA detectadas em surtos de diarreia é de grande importância para a identificação de novos genótipos virais, para a análise da diversidade genética, identificação de eventos de reassortimento e transmissão interespecíficas. O objetivo deste estudo foi realizar análises filogenéticas em três cepas de RVA identificadas em fezes diarreicas de leitões. As duas cepas virais do primeiro estudo (BRA381 e BRA382) foram selecionadas durante um estudo retrospectivo de genotipagem realizado em amostras fecais diarreicas positivas para o RVA pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida, por apresentarem resultados negativos em testes de genotipagem utilizando *primers* genótipo-específico para os principais protótipos de RVA de origem humana e animal (bovino e suíno). A cepa viral do segundo estudo (BRA843) foi selecionada para a análise de todos os genes por ser uma cepa G4P[6] diferente do protótipo suíno, a cepa *Gottfried*. No primeiro estudo os produtos da RT-PCR dos genes VP7 (G) e VP4 (P) foram sequenciados e a análise filogenética possibilitou a identificação do genótipo G26P[13] e G26P[X] nas cepas BRA381 e BRA382, respectivamente. G26 é um genótipo raro que, até então, somente havia sido identificado em cepas de RVA suíno da Ásia (Japão e China) e, possivelmente, em uma cepa de origem humana da Tailândia. O genótipo P[13] é o terceiro genótipo mais comum em RVA suíno, porém a associação G26P[13] ainda não havia sido descrita em cepas de RVA em todo o mundo. No segundo estudo, a análise dos 11 genes de uma cepa (BRA843) de RVA suíno G4-IX P[6]-If, anteriormente caracterizada como distinta do protótipo G4P[6] (*Gottfried*) de origem suína, revelou estreita relação com cepas de RVA detectadas em suínos e também com cepas detectadas em humanos e animais provenientes de reassortimento com cepas suínas. Estas características sugerem que a cepa BRA843 seja de origem suína. A constelação de genótipos (G4-P[6]-I5-R1-C1-M1-A8-C1-T7-E1-H1) identificada nesta cepa brasileira de RVA suíno tem estrutura *Wa-like* com genótipos comumente detectados em cepas de RVA de origem suína. O genótipo T7 é um genótipo raro que foi primeiramente descrito na cepa de RVA UK (protótipo) de origem bovina. Posteriormente, o genótipo T7 foi relatado em cepas de RVA de humanos provenientes de reassortimento com cepas suínas e bovinas. Recentemente, o genótipo T7 foi também identificado em cepas de RVA suíno reforçando a origem suína deste genótipo. No Brasil, este é o primeiro estudo com análise de todos os genes de uma cepa suína de RVA G4P[6], bem como a primeira descrição de uma cepa G4P[6] suína detectada em um hospedeiro suíno carregando o genótipo T7. Os dois estudos revelaram a complexidade de genótipos de RVA circulantes em rebanhos suínos brasileiros, bem como a importância da análise de todos os genes para a compreensão dos mecanismos de evolução das cepas de rotavírus e o papel dos suínos como reservatórios de uma constelação de genótipos de RVA passíveis de infectar tanto animais quanto humanos.

Palavras-chave: Suíno. Diarreia. Rotavírus grupo A. Genótipos. Genoma.

ABSTRACT

LORENZETTI, Elis. **Molecular analysis of uncommon porcine group A rotavirus strains.** 2014. 126p. Thesis (Doctor's Degree in Animal Science) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2014.

ABSTRACT

Neonatal diarrhea is a major health problem that affects piglets worldwide. In intensive pig production systems, the porcine group A rotavirus (RVA) is one of the main causes of diarrhea in suckling and recently weaned piglets. The characterization of genotypes of the RVA strains detected in diarrhea outbreaks is important for the identification of new genotypes, for the analysis of genetic diversity, identification of reassortment and interspecies transmission events. The aim of this study was to perform the phylogenetic analysis of three RVA strains identified in diarrheic fecal samples of piglets. The two strains from the first study (BRA381 and BRA382) were selected during a retrospective genotyping study performed in RVA-positive diarrheic fecal samples by polyacrylamide gel electrophoresis technique, by negative results in genotyping assays using genotype-specific primers for the main RVA prototypes of human and animal origin (bovine and porcine). The strain from the second study (BRA843) was chosen for analysis of the all genes for being a G4P[6] strain different to porcine prototype, the Gottfried strain. In the first study, the RT-PCR products of the VP7 (G) and VP4 (P) genes were sequenced and the phylogenetic analysis allow the identification of the genotype G26P[13] and G26P[X] in the BRA381 and BRA382 strains, respectively. G26 is a rare genotype, which until then, had only been identified in porcine RVA strains from Asia (Japan and China) and, probably, in a human origin strain from Thailand. P[13] is the third most common genotype in porcine RVA, but the combination G26P[13] had not still been reported in RVA strains worldwide. In the second study, the analysis of the all genes of a G4-IX P[6]-If porcine RVA strain (BRA843), previously characterized as distinct from the G4P[6] porcine prototype (Gottfried), revealed close relationship with RVA strains detected in pigs and also with porcine-like human and porcine-like animal RVA strains. These characteristics suggest that BRA843 strain is a porcine strain. The genotype constellation (G4-P[6]-I5-R1-C1-M1-A8-C1-T7-E1-H1) identified in this Brazilian porcine RVA field strain has the Wa-like structure with genotypes commonly detected in porcine RVA strains. T7 is a rare genotype that was first described in the UK RVA strain (prototype) of bovine origin. Afterwards, the T7 genotype was identified in human RVA strains derived from reassortment with porcine and bovine RVA strains. Recently, the T7 genotype was also identified in porcine RVA strains reinforcing the porcine origin of this genotype. In Brazil, this is the first study where all genes of a porcine G4P[6] RVA strain were analyzed, as well as, the first description of G4P[6] porcine RVA strain detected in a pig host bearing the T7 genotype. The two studies reveals the complexity of RVA genotypes circulating in Brazilian pig herds, as well as, the importance of analyzing all genes for understanding the mechanisms of evolution of the RVA strains and the role of pigs as reservoirs of a RVA genotype constellation able to infect both animals and humans.

Keywords: Pig. Diarrhea. Group A rotavirus. Genotypes. Genome.

LISTA DE FIGURAS

Revisão de Literatura

Figura 1 - Eletroforese em gel de poliacrilamida do genoma do rotavírus, RNA fita dupla, segmentado (A) e as proteínas codificadas por cada segmento genômico (B). Partícula de rotavírus representada esquematicamente (C); partícula de rotavírus e sua estrutura determinada por eletromicroscopia associada ao processamento de imagem por computador (D)..... 18

First detection of an uncommon genotype combination (G26P[13]) of porcine group A rotavirus

Figure 1 - Phylogenetic tree based on the partial nucleotide sequences of the VP7 gene from the porcine RVA strains described in this study and representative strains of the 27 genotypes recognized thus far. The tree was constructed using neighbor-joining method and the Kimura two-parameter model for nucleotide substitution. The bootstrap values are shown at the branch nodes (values <50% are not shown). The scale bars at the bottom of the trees represents nucleotide substitutions per site. Tree for the G26 strains (A). GenBank accession numbers of the reference strains are indicated between parentheses. The Brazilian porcine RVA strains are marked with a filled circle..... 57

Figure 2 - Phylogenetic tree based on the partial nucleotide sequences of the VP4 (VP8*) gene from the porcine RVA strains described in this study, representative strains of the 37 genotypes recognized thus far, and representative strains of the P[13] genotype. The tree was constructed using neighbor-joining method and the Kimura two-parameter model for nucleotide substitution. The bootstrap values are shown at the branch nodes (values <50% are not shown). The scale bars at the bottom of the trees represents nucleotide substitutions per site. Tree for the P[13] strains (A). GenBank accession numbers of the reference strains are indicated between parentheses. The Brazilian porcine RVA strain is marked with a filled circle.....57

Genomic analysis of G4P[6] porcine group A rotavirus

Figure 1- Phylogenetic analyses based on the nucleotide sequences of structural proteins (A) VP1, (B) VP2, (C) VP3, and (D) VP6 and nonstructural proteins (E) NSP1, (F) NSP2, (G) NSP3, (H) NSP4, and (I) NSP5 of encoding genes of BRA843 porcine RVA strain with representative human and animal RVA strains. The trees were constructed using the neighbor-joining method, Kimura two-parameter model with 1,000 bootstrap replicates (values >70% are shown). The scale bars at the bottom of the trees represents nucleotide substitutions per site. The Brazilian porcine RVA strain described in this study is indicated by filled circle. An outgroup sequence (RVA/Pigeon-tc/JPN/PO-13/1983/G18P[17]) of each gene was included. GenBank accession numbers of reference strains are indicated between parentheses 85

LISTA DE TABELAS

Revisão de Literatura

Tabela 1 - Porcentagem de identidade de nucleotídeo para cada gene (ponto de corte) que define os genótipos para os 11 segmentos gênicos do rotavírus do grupo A..... 22

Tabela 2 - Exemplos de cepas utilizando a nova nomenclatura do rotavírus grupo A..... 24

Tabela 3 - Constelação genômica de cepas de rotavírus grupo A humano e suíno. Os genótipos são representados pela cor verde (genótipo suíno/humano), vermelho (genótipo bovino/humano), azul (genótipo típico suíno) e amarelo (genótipos G4 e P[6]). Genes parcialmente sequenciados estão em itálico 30

Genomic analysis of G4P[6] porcine group A rotavirus

Table 1 - Genotype constellation and genetic relatedness of the 11 gene segments of G4P[6] porcine RVA strain described in the present study (letters in bold) with other relevant RVA strains from several species. Genotypes are color green (porcine/human genotypes), red (bovine/human genotypes), blue (typical porcine genotypes), purple (typical bovine genotype), and yellow (G4 and P[6] genotypes) 95

Table 2- Origin and highest percentage identity of Brazilian RVA/Pig-wt/BRA/BRA843/2007/G4P[6] group A rotavirus strain based on nucleotide levels 96

LISTA DE QUADROS

Revisão de Literatura

Quadro 1- Características gerais das proteínas codificadas pelos segmentos genômicos do rotavírus e a porcentagem de identidade de nucleotídeo (nt) para cada gene (valor de corte)	19
--	----

SUMÁRIO

1	REVISÃO DE LITERATURA	15
1.1	INTRODUÇÃO	15
1.2	ROTAVÍRUS	17
1.3	ROTAVÍRUS GRUPO A (RVA)	20
1.4	ROTAVÍRUS SUÍNO GRUPO A	24
1.5	RELAÇÃO ENTRE ROTAVÍRUS GRUPO A DE ORIGEM HUMANA E SUÍNA	26
1.6	REFERÊNCIAS	32
2	OBJETIVOS	42
2.1	OBJETIVO GERAL	42
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
3	ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO	43
3.1	First detection of an uncommon genotype combination (G26P[13]) of porcine group A rotavirus	44
	Abstract	45
1.	Introduction	46
2.	Materials and Methods	47
2.1	<i>Fecal samples</i>	47
2.2	<i>dsRNA extraction and RT-PCR assay</i>	48
2.3	<i>Sequencing and phylogenetic analysis</i>	48
2.4	Nucleotide sequence accession numbers	49
3.	Results	49
4.	Discussion	50
	References	53
3.2	Genomic analysis of G4P[6] porcine group A rotavirus	61
	Abstract	62
1.	Introduction	63
2.	Materials and Methods	65
2.1	<i>RVA strain</i>	65

2.2	<i>Nucleic acid extraction and RT-PCR assays</i>	65
2.3	<i>DNA sequencing and phylogenetic analysis</i>	66
2.4	<i>GenBank accession numbers</i>	66
3.	Results.....	67
3.1.	<i>Genotype constellation of BRA843 G4P[6] porcine RVA strain</i>	67
3.2	<i>Phylogenetic and sequence analyses of the structural genes (VP1, VP2, VP3, and VP6)</i>	68
3.3	<i>Phylogenetic and sequence analyses of the non-structural genes (NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, and NSP5)</i>	69
4.	Discussion	71
5.	Conclusion.....	74
	References	76
4.	CONCLUSÕES	98
	APÊNDICES	99
	APÊNDICE A - <i>Árvore filogenética do gene VP4 (VP8*) - Cepa BRA843</i>	100
	APÊNDICE B - <i>Árvore filogenética do gene VP7 - Cepa BRA843</i>	101
	ANEXOS	102
	ANEXO A - <i>Lista de reagentes</i>	103
	ANEXO B - <i>Soluções e tampões</i>	107
	ANEXO C- <i>Protocolo de técnicas</i>	116
	ANEXO D - <i>Lista de softwares</i>	125

1. REVISÃO DE LITERATURA

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 INTRODUÇÃO

No Brasil, a suinocultura tem contribuído consideravelmente com os números favoráveis que o agronegócio tem proporcionado, a cada ano, à economia do país. A cadeia produtiva do suíno é importante fonte geradora de impostos, divisas e empregos (diretos e indiretos) nas áreas rural e urbana (ABIPECS, 2014). Atualmente, no Brasil, existe aproximadamente 2,41 milhões de matrizes suínas alojadas, que são responsáveis pela produção de 41,3 milhões de suínos para o abate. Embora o tipo de criação seja essencialmente intensivo (industrial), o número de animais em criações de subsistência ainda é considerável (ABIPECS, 2014).

Com o aumento da produtividade, prolificidade e manejo intensivo dos rebanhos, os animais estão cada vez mais suscetíveis às doenças, principalmente os leitões nas primeiras semanas de vida. Por outro lado, também assume importância a avaliação de risco da exposição de seres humanos a patógenos para os quais os suínos possam atuar como reservatórios. Há a necessidade do constante monitoramento das características epidemiológicas das infecções e das características antigênicas e moleculares desses agentes etiológicos. Estudos direcionados nesse sentido têm gerado, simultaneamente, informações com impacto tanto em sanidade animal quanto em saúde pública (ALFIERI et al., 2007; ALFIERI; ALFIERI; BARRY, 2010; ALFIERI; LORENZETTI; ALFIERI, 2012).

Diversas doenças podem acometer os suínos, porém as infecções entéricas ocasionam consideráveis prejuízos econômicos para a suinocultura. Em 1993 Paul e Lyoo já abordavam que independentemente dos níveis de tecnificação da criação, as diarreias neonatais representam importante problema sanitário em rebanhos suínos de todo o mundo. Devido às altas taxas de morbidade e mortalidade, os prejuízos determinados pelos episódios de diarreia podem comprometer a exploração econômica dos suínos.

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

A síndrome diarreia ocorre tanto em animais lactentes quanto recém-desmamados,

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

A diarreia neonatal em suínos é considerada uma síndrome multifatorial e multietiológica. Fatores nutricionais e fisiológicos, manejo, alterações ambientais, imunidade do hospedeiro e agentes infecciosos podem estar envolvidos, tanto no desenvolvimento quanto na intensidade de diarreia. Na etiologia das infecções entéricas incluem-se protozoários (*Cryptosporidium* spp, *Isospora suis*, *Eimeria* sp.), bactérias (*Escherichia coli* enterotoxigênica, *Salmonella* spp., *Clostridium perfringens* tipo C, *Clostridium difficile*) e vírus (rotavírus, coronavírus, calicivírus) (ALFIERI et al., 1994, 1999a; KATSUDA et al., 2006; BARRY; ALFIERI; ALFIERI, 2008; LINARES et al., 2009; ALFIERI; ALFIERI; BARRY, 2010; MÉDICI et al., 2011; ALFIERI; LORENZETTI; ALFIERI, 2012).

Na dependência da faixa etária e/ou categoria animal, existem diferentes vírus entéricos que podem ocasionar infecções sintomáticas e/ou assintomáticas nos suínos. As partículas virais produzidas no final do ciclo infeccioso contaminam o ambiente e os animais infectados, apresentam excreção prolongada e altos títulos virais, (ESTES, 2001) fato que facilita a disseminação, sendo considerados fontes de infecção para outras faixas etárias de suínos e, em algumas situações, até mesmo para os seres humanos.

Do ponto de vista da sanidade animal, os vírus entéricos, tanto em infecções singulares quanto associados com outros micro-organismos patogênicos, aumentam as taxas de morbidade e de mortalidade dos rebanhos e afetam diretamente a rentabilidade dos sistemas de produção. Animais com sinais clínicos de diarreia e também aqueles com infecções subclínicas apresentam menor produtividade, como redução no ganho de peso e aumento na taxa de conversão alimentar, resultando na desuniformidade dos lotes o que constitui um dos principais problemas de manejo nos rebanhos comerciais (SILVA et al., 1998; ALFIERI et al., 2007; LINARES et al., 2009; MÉDICI et al., 2011). Adicionalmente, custos indiretos como a assistência aos animais doentes e compra de medicamentos, além da predisposição desses animais a outras infecções, incluindo outros sistemas orgânicos que não o gastrointestinal, contribuem com o aumento nos custos de produção. Em termos de saúde pública, a detecção e, principalmente, a caracterização molecular precoce dos patógenos

circulantes nos rebanhos é de extrema importância, em função de que na dependência das características da população e do patógeno envolvido, algumas doenças podem ser fatais para os seres humanos (PARASHAR et al., 2003).

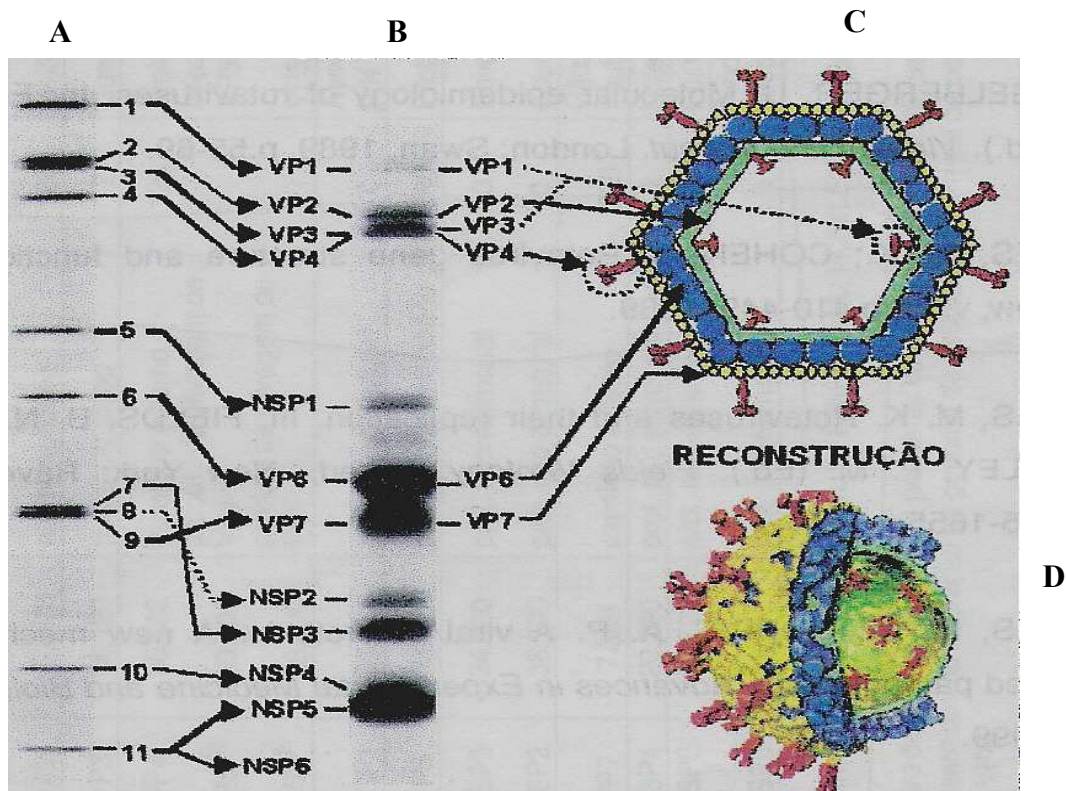
1.2 ROTAVÍRUS

Dentre os episódios diarreicos de etiologia viral destacam-se os ocasionados pelo *Rotavirus*, que é um gênero da família *Reoviridae*. O vírion, desprovido de envelope lipoprotéico, tem aproximadamente 70-90 nm de diâmetro e é constituído por 11 segmentos de RNA de fita dupla (dsRNA), circundado por três camadas proteicas concêntricas de simetria icosaédrica, que formam as camadas externa, intermediária e interna do capsídeo (ESTES; KAPIKIAN, 2007).

Cada segmento genômico do rotavírus codifica uma proteína viral, exceto o segmento onze, que codifica duas proteínas, totalizando seis proteínas estruturais, denominadas VP (*viral protein*), e seis proteínas não-estruturais, denominadas NSP (*non-structural protein*). Na camada interna do capsídeo, também denominada de *core* ou núcleo viral, estão dispostas as proteínas VP1, VP3 e VP2, sendo que as duas primeiras estão intimamente associadas ao genoma viral. A camada intermediária é formada pela proteína VP6 e a camada externa é constituída pelas proteínas VP4 e VP7, que são responsáveis por aumentar a infectividade viral. A clivagem enzimática da proteína VP4 origina dois pequenos polipeptídeos denominados VP5* e VP8*. As proteínas não-estruturais do rotavírus são denominadas NSP1-NSP5/6 e estão presentes em partículas virais maduras (Figura 1) (PATTON, 1995; ESTES; KAPIKIAN, 2007). O quadro 1 apresenta algumas características importantes de todas as proteínas do rotavírus grupo A (RVA).

A proteína estrutural VP6, que forma a camada intermediária do capsídeo, é a proteína mais abundante do vírion. De acordo com as características antigênicas e moleculares desta proteína, os rotavírus são classificados em oito grupos / espécies (A-H) distintas, sendo que cada grupo apresenta o seu próprio antígeno comum (ESTES; KAPIKIAN, 2007; MATTHIJNSSENS et al., 2012). Dos oito grupos de rotavírus, os grupos A, B, C e H já foram descritos em humanos e em outros animais sendo considerados de importância epidemiológica para seres humanos e animais (ALFIERI et al., 1999b; RAHMAN et al., 2007; SANTOS et al., 2008; STEYER et al., 2008; MÉDICI et al., 2010). Os outros grupos D, E, F e G de rotavírus apenas foram detectados em animais (PEDLEY et al., 1986; DEVITT; REYNOLDS, 1993; OTTO et al., 2012). Entretanto, a maioria das cepas virais identificadas

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



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

em seres humanos e animais com diarreia pertencem ao RVA (ALFIERI et al., 2006; SANTOS et al., 2008; LINARES et al., 2009; LORENZETTI et al., 2011; MÉDICI et al., 2011).

Quadro 1 – Características gerais das proteínas codificadas pelos segmentos genômicos do rotavírus e a porcentagem de identidade de nucleotídeo (nt) para cada gene (valor de corte).

Gene ⁽¹⁾	Tamanho (pb)	Proteína	Massa Molec. (Da)	Localização	Funções/Processo biológico	Genotipos (n) ^b	% nt (ponto de corte)
1	3.302	VP1	125.005	Nucleocapsídeo	RNA polimerase dependente de RNA	R (9)	83
2	2.690	VP2	102.431	Nucleocapsídeo	União ao RNA/Formação do nucleocapsídeo	C (9)	84
3	2.591	VP3	98.120	Nucleocapsídeo	Guanililtransferase/Metiltransferase/Proteína Básica	M (8)	81
4	2.362	VP4	86.782	Capsídeo externo	Proteína de união à célula/Interage com VP6	P (37)	80 (89) ^a
		VP5 ⁽²⁾	60.000	Produto da clivagem de VP4	Infectividade viral aumenta após clivagem pela tripsina formando VP5 e VP8		
		VP8 ⁽²⁾	28.000	Produto da clivagem de VP4	VP5 permeabiliza membranas		
5	1.611	NSP1	58.654	Proteína não estrutural	Associa-se com citoesqueleto/Interage com fator 3 regulatório de IFN	A (18)	79
6	1.356	VP6	48.160	Capsídeo intermediário	Proteína estrutural do capsídeo intermediário/Antígeno de subgrupo	I (17)	85
7	1.105	NSP3	34.600	Proteína não estrutural	Envolvida na regulação da tradução	T (12)	85
8	1.059	NSP2	34.700	Proteína não estrutural	Acumula-se em viroplasmas/Atividade NTPase/Liga NSP5 e VP1	N (10)	85
9	1.062	VP7	7.368	Capsídeo externo	Glicoproteína estrutural do capsídeo externo/Antígenos neutralizantes G-tipo	G (27)	80 (89) ^a
10	751	NSP4	20.290	Proteína não estrutural	Enterotoxina/Receptor para partícula com duplo capsídeo no RE	E (15)	85
11	667	NSP5	21.725	Proteína não estrutural	Possível cinase autocatalítica /Interage com VP2, NSP2 e NSP6	H (11)	91
		NSP6	11.012	Proteína não estrutural	Produto da ORF2 do gene 11/Interage com NSP5/Localizada em viroplasmas		

(1) Segmentos numerados com base na migração do genoma da cepa SA11 em gel de poli-acrilamida.

(2) Produtos da clivagem de VP4.

(a) Valor de corte baseado na identidade de aminoácido.

(b) n, número de genotipos.

Fonte: adaptado de ESTES, M. K. Rotaviruses and their replication. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Ed) Fields Virology. 4th ed. Philadelphia: Lippincott & Wilkins, 2001; MATTHIJNSSENS et al., 2008a (com modificações); MATTHIJNSSENS et al., 2011; GUO et al., 2012; PAPP et al., 2012; TROJNAR et al., 2013; JERE et al., 2014.

Nota: Outras espécies dentro do gênero podem ter proteínas com diferenças significativas de tamanho.

1.3 ROTAVÍRUS GRUPO A (RVA)

Com base na diversidade antigênica das proteínas estruturais VP7 e VP4, localizadas na camada externa do capsídeo, ou dos segmentos genômicos que as codificam, é possível à caracterização das cepas do RVA em sorotipos ou genotipos, respectivamente. Com isso, de acordo com as características antigênicas da glicoproteína VP7 e da proteína VP4, protease sensível, o RVA é classificado por um sistema binário em G e P tipos, respectivamente (KAPIKIAN; HOSHINO; CHANOCK, 2001).

Por meio da análise molecular das sequências dos genes VP7 e VP4, foram descritos, até o momento, 27 G genotipos e 37 P genotipos em cepas de RVA identificadas em seres humanos e em várias espécies de animais, incluindo mamíferos e aves (MATTHIJNSSENS et al., 2011; TROJNAR et al., 2013). Essa diversidade de genotipos demonstra a extensa variabilidade antigênica e molecular desse grupo de rotavírus necessitando, assim, de estudos mais detalhados para as outras proteínas que compõem o genoma viral.

As características antigênicas (sorotipos) e moleculares (genotipos) das cepas de rotavírus são importantes para definir a extensão da diversidade dos vírus circulantes em um determinado período de tempo e região geográfica. Além disso, comparações das cepas de RVA de origem humana e animal podem gerar conhecimentos adicionais sobre a evolução deste vírus entre as espécies animais (RÁCZ et al., 2000; MARTELLA et al., 2006a; PARK et al., 2011; DEGIUSEPPE et al., 2013). Por meio de estudos moleculares, a genotipagem foi considerada a forma mais fácil e eficaz para a definição dos sorotipos/genotipos do RVA, principalmente por apresentar boa correlação com a especificidade antigênica, utilizar reagentes sintéticos universais, possibilitar a análise de grande número de amostras simultaneamente, além de demonstrar boa sensibilidade e especificidade (GOUVEA et al., 1990; WINIARCZYK et al., 2002). Na década de 90, pesquisadores de diferentes grupos selecionaram oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) para detectar G e P tipos em amostras de RVA provenientes de humanos e animais pela *multiplex-nested-PCR* (GENTSCH et al., 1992; DAS et al., 1994; GOUVEA et al., 1994a, 1994b).

Em algumas situações observa-se dificuldade, ou mesmo impossibilidade, em identificar os genotipos de RVA pela genotipagem por RT-PCR destacando-se entre elas: i) a diversidade de genotipos G e P de RVA descritos em diferentes espécies animais não contemplados pelos *primers* utilizados; ii) o acúmulo de mutações pontuais no sítio de ligação dos *primers* dos genes VP7 e VP4; iii) a ocorrência de infecções mistas; iv) as variações gênicas decorrentes de mutações, recombinações e rearranjos genéticos; e v) a presença de

inibidores da RT-PCR nas amostras de fezes. Estes fatores fazem com que a técnica de genotipagem por RT-PCR com a utilização de *primers* específicos deva ser acompanhada pelo sequenciamento e análise de nucleotídeos (nt) e/ou da sequência deduzida dos resíduos de aminoácidos (aa) do produto da RT-PCR dos genes VP4 e VP7 obtidos com os *primers* consensuais. Alguns estudos utilizam a clonagem como uma técnica adicional em casos, por exemplo, de infecção mista (MASCARENHAS et al., 2007).

Considerando a complexidade dos sistemas utilizados para a classificação das cepas de RVA identificadas em infecções em seres humanos e animais, atualmente, um novo sistema de classificação para o rotavírus foi proposto e vem sendo adotado, ampliando o sistema binário de classificação. A proposta baseia-se no sequenciamento e caracterização do genoma completo (11 proteínas, estruturais e não-estruturais) da cepa viral em estudo e está sendo considerada a alternativa mais viável para a classificação de novas cepas virais (MATTHIJNSSENS et al., 2008a). Essa estratégia é interessante, principalmente devido à grande diversidade antigênica observada em cepas de RVA provenientes de diferentes espécies de hospedeiros e também devido à possibilidade da ocorrência de ressortimentos (MATTHIJNSSENS et al., 2008a; TSUGAWA; HOSHINO, 2008; MUKHERJEE et al., 2009, 2011; GHOSH et al., 2012a, 2012b; DONG et al., 2013).

Este novo sistema de classificação recomenda o sequenciamento completo ou parcial (mais de 50% do tamanho total do gene, e pelo menos, 500 pares de bases) de todos os 11 segmentos genômicos do vírus. Quando for utilizado o sequenciamento parcial, a identidade entre a cepa viral estudada e as cepas pertencentes a um determinado genotipo deve ser ao menos 2% superior ao ponto de corte apropriado para o determinado gene. Este sistema permite melhor análise da diversidade genética, replicação, virulência, restrição a determinados hospedeiros, identificação de eventos de ressortimento e transmissão interespecie, além de proporcionar maior compreensão sobre as estratégias de evolução dos rotavírus do grupo A (MATTHIJNSSENS et al., 2008a).

Este sistema de classificação permite a identificação de genotipos distintos; a avaliação da transmissão interespecie; a compreensão dos eventos de rearranjos genéticos; além de possibilitar a determinação do gene que revela a origem comum entre cepas virais de origem humana e animal. À semelhança de G e P genotipos, foi proposta uma nomenclatura que considera as funções das proteínas virais, que inclui os genotipos: **I** (Intermediate capsid shell – VP6); **R** (RNA-dependent RNA polymerase – VP1); **C** (Core shell protein – VP2); **M** (Methyltransferase – VP3); **A** (Interferon Antagonist – NSP1); **N** (NTPase – NSP2); **T** (Translation enhancer – NSP3); **E** (Enterotoxin – NSP4); **H** (pHosphoprotein – NSP5/NSP6)

(Matthijnsens et al., 2008a, 2008b). Portanto, a nova proposta de classificação é baseada na análise dos genótipos Gx-P[x]-Ix-Rx-Cx-Mx-Ax-Nx-Tx-Ex-Hx, que representam respectivamente os genes VP7-VP4-VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5/6, sendo que a letra x indica o número do genótipo (MATTHIJNSSENS et al., 2008a, 2008b). O quadro 1 e a tabela 1 apresentam o número de genótipos identificados, até o momento, considerando essa nova proposta de classificação do RVA.

De acordo com este sistema de classificação, até o presente momento foram descritos 17I (VP6), 9R (VP1), 9C (VP2), 8M (VP3), 18A (NSP1), 10N (NSP2), 12T (NSP3), 15E (NSP4) e 11H (NSP5/6) genótipos de rotavírus grupo A utilizando como ponte de corte 85, 83, 84, 81, 79, 85, 85, 85 e 91% de identidade de nucleotídeos para cada gene, respectivamente (Tabela 1) (MATTHIJNSSENS et al., 2011; GUO et al., 2012; PAPP et al., 2012; TROJNAR et al., 2013; JERE et al., 2014).

Tabela 1 Porcentagem de identidade de nucleotídeo para cada gene (ponto de corte) que define os genótipos para os 11 segmentos gênicos do rotavírus do grupo A.

Produto gênico	Ponto de corte (%)	Genótipo (n) ^b	Descrição do produto gênico
VP7	80 (89) ^a	G (27)	<i>Glycosylated</i>
VP4	80 (89) ^a	P (37)	<i>Protease sensitive</i>
VP6	85	I (17)	<i>Intermediate capsid Shell</i>
VP1	83	R (9)	<i>RNA-dependent RNA Polymerase</i>
VP2	84	C (9)	<i>Core shell protein</i>
VP3	81	M (8)	<i>Methyltransferase</i>
NSP1	79	A (18)	<i>Interferon Antagonist</i>
NSP2	85	N (10)	<i>NTPase</i>
NSP3	85	T (12)	<i>Translation enhancer</i>
NSP4	85	E (15)	<i>Enterotoxin</i>
NSP5	91	H (11)	<i>pHosphoprotein</i>

^a Ponto de corte baseado na porcentagem de aminoácido.

^b Número de genótipos

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

Esse novo sistema de classificação tem proporcionado vários avanços nos estudos com rotavírus destacando-se: i) aumento considerável nos conhecimentos acumulados em relação às características antigênicas e moleculares das cepas virais isoladas de humanos e animais; ii) aumento no número de isolados com sequência genômica completa disponíveis em bases públicas de dados. Devido à inexistência de regras para nominar as cepas já descritas de

rotavírus grupo A e com o desenvolvimento de fontes específicas para recuperar e analisar as sequências disponíveis, um novo sistema padrão para a nomenclatura das cepas virais identificadas também foi proposto. O nome dos isolados deve conter o grupo ou a espécie de rotavírus / espécie de origem / local (país) da identificação / nome comum do isolado / ano de identificação / G e P tipo. Os grupos de rotavírus são denominados como: RVA, RVB, RVC, RVD, RVE, RVF, RVG, RVH, ou ainda RVX, quando o grupo não foi identificado (MATTHIJNSSENS et al., 2011) (Tabela 2).

A espécie de origem contém dois componentes, sendo que o primeiro refere-se à espécie animal em que o isolado foi detectado, sempre considerando o vernáculo inglês (*human, pig, cow, dog, cat, rhesus, simian, horse, rabbit, mouse, goat, sheep, guanaco, bat, turkey, chicken, pheasant, sugar glider or other*). Se as amostras forem obtidas do ambiente (esgoto, solo, rio, lago, oceano ou similar) deve ser utilizada a palavra “Env” (*environment*). As amostras vacinais devem ser seguidas da palavra “Vaccine”, já as cepas virais geradas em laboratório e que sofreram grandes modificações devem utilizar “LabStr”. Se a espécie for desconhecida usa-se “X”. O segundo componente pode ser “-wt” (*wild-type*) para cepas de campo ou selvagens, “-tc” (*tissue-culture-adapted*) para cepas virais adaptadas em cultivo celular e ainda “-lab” (*laboratory-generated or -engineered*) para cepas que sofreram pequenas alterações em laboratório (MATTHIJNSSENS et al., 2011) (Tabela 2).

O país de identificação deve ser apresentado de forma abreviada contendo apenas três letras. Se o nome do país for desconhecido, deve-se utilizar “XXX”. O nome da cepa é dado pelos pesquisadores e este pode conter informações clínicas/geográficas relevantes ou mutações específicas, mas não deve exceder 15 caracteres. Com relação ao ano de identificação deve-se usar o formato “yyyy”, mas se este for desconhecido deve-se usar “XXXX”. Para o G tipo usa-se a forma G_x, sendo que x é o número do genotipo/sorotipo estabelecido. Se o genotipo G for desconhecido deve-se usar GX. Já com relação ao P tipo deve-se usar a forma P_y[z], onde y refere-se ao sorotipo e [z] ao genotipo. Se o sorotipo P for desconhecido deve-se usar P[z], porém se o genotipo P for desconhecido deve-se usar P_y[X] ou P[X] (MATTHIJNSSENS et al., 2011) (Tabela 2).

Tabela 2 - Exemplos de cepas utilizando a nova nomenclatura do rotavírus grupo A.

RVA/Pig-wt/BRA/BRA843/2007/G4P[6]
RVA/Human-tc/USA/Wa/1974/G1P1A[8]
RVA/Pig-wt/THA/CMP034/2000/G2P[27]
RVA/Cow-lab/GBR/PP-1/1976/G3P[7]
RVA/Env/CHE/River-Swiss/1998/G3P[X]
RVA/Labstr/USA/RRV-E4/1996/G3P[20]
RVA/Vaccine/USA/Rotarix-RIX4414/1988/G1P1A[8]
RVA/Mouse-tc/USA/ETD_822/XXXX/G16P[16]
RVA/Pheasant-wt/HUN/Phea14246/2008/G23P[?]

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

1.4 ROTAVÍRUS SUÍNO GRUPO A

Dentre os vários genótipos G e P de RVA descritos, os genótipos G mais frequentemente identificados em infecções entéricas em suínos são G3, G4, G5 e G11, associados com P[6] e P[7], que são considerados os genótipos P mais comuns nessa espécie animal (NAGESHA; HOLMES, 1988; RUIZ et al., 1988; CIARLET et al., 1994; GOUVEA et al., 1994a; WINIARCZYK et al., 2002; BARREIROS et al., 2003; PAPP et al., 2013b). As combinações mais frequentes de G e P tipos em cepas de RVA suíno são: G5P[7] (OSU); G4P[6] (*Gottfried*); G11P[7] (YM) e G3P[7] (CRW8). Outros genótipos G e P como G1, G2, G6, G8, G9, G10, G12, G26, P[1], P[5], P[8], P[11], P[13], P[13]/P[22], P[19], P[23], P[26], P[27], P[32] e P[34] também já foram descritos em cepas de RVA provenientes de suínos (HUANG et al., 1993; BURKE et al., 1994; MARTELLA et al., 2006b, 2007; KHAMRIN et al., 2007; STEYER et al., 2007; COLLINS et al., 2010a; MATTHIJNSSENS et al., 2011; OKITSU et al., 2013).

O genótipo G26 foi detectado pela primeira vez em um leitão com cinco dias de idade com diarreia em Miyazaki no Japão (cepa TJ4-1) (MIYAZAKI et al., 2011). Posteriormente, este genótipo foi detectado em um leitão em Hebei Lulong na China (cepa Z650, número de acesso no GenBank: KC292205) (LI, 2013, dados não publicados). Até o presente momento, o genótipo G26 foi detectado somente em leitões de países Asiáticos. Adicionalmente, o genótipo G26 foi detectado em combinação com o genótipo P[7] (MIYAZAKI et al., 2011) que é considerado o genótipo P mais frequente em leitões (MIYAZAKI et al., 2012; PAPP et al., 2013b).

A cepa de rotavírus humano grupo A 57vp7W foi identificada na Tailândia e foi classificada como G3P[19], entretanto, esta cepa apresenta alta identidade de nucleotídeos (94%) com as cepas de rotavírus suíno grupo A que pertencem ao genótipo G26

(THEAMBOONLERS et al., 2008). Miyazaki et al. (2011) sugeriram que a cepa 57vp7W pode ser considerada um ressortimento suíno-humano ou uma cepa suína e, conseqüentemente, que o genotipo G26, anteriormente detectado somente em suínos, pode também ser detectado em humanos.

O genotipo P[13] é considerado o terceiro genotipo P mais prevalente em leitões (espécie-específico) (PAPP et al., 2013b) e tem sido identificado em combinação com os genotipos G2, G3, G4, G5, G6, G9 e G11 (GHOSH et al., 2007; COLLINS et al., 2010b; MIYAZAKI et al., 2012; PAPP et al., 2013b; SAIKRUANG et al., 2013). Em rebanhos suínos brasileiros o genotipo P[13] já foi detectado em associação com os genotipos G3 e G9 (TONIETTI et al., 2013). O genotipo P[13] já foi detectado na Europa (COLLINS et al., 2010b), na Ásia (GHOSH et al., 2007; CHAN-IT et al., 2008; SAIKRUANG et al., 2013), na Oceania (HUANG et al., 1993), na América do Norte (AMIMO et al., 2013), e na América do Sul (TONIETTI et al., 2013). Este genotipo também já foi detectado em javalis no Japão (OKADERA et al., 2013).

Os rotavírus são considerados espécie-específicos, entretanto, infecções heterólogas são relatadas com certa frequência. As infecções heterólogas são originadas quando uma cepa de rotavírus, característica de um determinado hospedeiro, infecta outra espécie animal. Desse modo, seres humanos também estão suscetíveis à infecção caso os suínos se infectem com uma cepa que seja adaptada para ambas às espécies de hospedeiros. Assim como ocorre para os outros animais contactantes de um animal excretando o vírus, o elevado número de partículas virais eliminado nas fezes (10^{10} a 10^{12} /grama de fezes) para o ambiente também aumenta a probabilidade de infecção de seres humanos (ALFIERI et al., 2007).

Alguns genotipos G1, G2, G9, G12 e P[6] (cepas *M37-like*) e P[8], normalmente encontrados em humanos, assim como os encontrados em bovinos (G6, G8, G10, P[1], P[5] e P[11]) também têm sido descritos em suínos (CIARLET; LIPRANDI, 1994; GOUVEA et al., 1994a, 1994b; PONGSUWANNA et al., 1996; SANTOS et al., 1999; MARTELLA et al., 2001, 2005, 2006a; GHOSH et al., 2006). Considerando a ocorrência de infecções heterólogas, os suínos podem ser considerados reservatórios de cepas de RVA para os humanos e, até mesmo, para outras espécies animais, se estes forem infectados com uma cepa que seja bem adaptada nas duas espécies (PARK et al., 2011; GHOSH et al., 2012a, 2012b; DONG et al., 2013; GUO et al., 2013).

Os animais podem atuar como reservatórios do RVA para a infecção de seres humanos. Como o genoma do vírus é segmentado, pode ocorrer o ressortimento, que é a troca entre os segmentos genômicos de cepas virais distintas quando estas infectam a mesma célula,

originando diferentes genótipos. Este mecanismo favorece a evolução viral, além da possível adaptação a outros hospedeiros, inclusive o homem (ALFIERI et al., 1996; PALOMBO, 2002; MARTELLA et al., 2010; MAESTRI et al., 2012; DONG et al., 2013).

Com base na comparação das sequências e na análise filogenética, as três cepas protótipos pertencentes ao sorotipo P2 (M37-P2A[6]; Gottfried-P2B[6]; e AU19-P2C[6]), têm sido consideradas geneticamente como três linhagens distintas do genótipo P[6], nomeadas como linhagens I, II e III, respectivamente (NAKAGOMI et al., 1999; MARTELLA et al., 2006a). Posteriormente, duas novas linhagens P[6], geneticamente distintas das linhagens anteriormente descritas, foram identificadas em cepas de RVA descritas em humanos na Hungria, sendo nomeadas como linhagens IV e V, e são representadas pelas cepas virais BP1198/98-*like* e BP720/93-*like*, respectivamente (BÁNYAI et al., 2004). As linhagens das cepas P[6] dos RVA ainda podem ser classificadas em sublinhagens, sendo que até o momento a linhagem I apresenta seis sublinhagens (Ia-I_f) e a linhagem V apresenta duas sublinhagens (Va-Vb) (MARTELLA et al., 2006a; MASCARENHAS et al., 2007; STUPKA et al., 2009). O genótipo G4 tem sido classificado em 10 linhagens diferentes (I-X) (DONG et al., 2013), sendo que algumas delas são compostas por cepas humanas e suínas. As linhagens I e VII são divididas em sublinhagens.

1.5 RELAÇÃO ENTRE ROTAVÍRUS GRUPO A DE ORIGEM HUMANA E SUÍNA

A ocorrência de infecções heterólogas entre humanos e animais, caracterizando o caráter zoonótico da rotavirose, tem sido descrita com relativa frequência (MARTELLA et al., 2010). Atualmente, diversos estudos suportam ou reforçam a hipótese de que há uma interação dinâmica entre cepas de RVA identificadas em seres humanos e em animais, e que ressортimentos podem resultar na introdução de genes em rotavírus humanos. Evidências para ressортimento genético entre cepas de RVA de origem humana ou animal têm sido obtidas, particularmente com as espécies bovina e suína (MARTELLA et al., 2008; STEYER et al., 2008; MAESTRI et al., 2012; DONG et al., 2013; PAPP et al., 2013a).

Uma cepa de RVA, isolada de uma criança chinesa de 18 meses de idade, apresentou padrão eletroforético semelhante à cepa Wa de rotavírus humano grupo A (LI et al., 2008). Por meio de análises filogenéticas dos genes VP7 e VP4, esta cepa viral foi classificada como G5P[6] e agrupou na árvore filogenética juntamente com cepas virais suínas. A proteína NSP4 desta cepa viral demonstrou ser de origem humana. Com isso, os autores propuseram a ocorrência de interação entre rotavírus de origem humana e animal, e sugeriram que o

ressortimento poderia resultar na introdução estável e na expansão bem sucedida de genes de origem suína em rotavírus humano grupo A (LI et al., 2008).

Em seres humanos, o genótipo G3 de RVA geralmente está associado ao genótipo P[8]. Uma combinação incomum de rotavírus grupo A genótipo G3P[6] foi descrita na Itália (MARTELLA et al., 2008). A análise da sequência de aa desta cepa viral revelou a presença de VP6 e NSP4 de origem humana e de VP4 (VP8*) de origem suína. Essa associação evidencia a ocorrência de infecção heteróloga que pode ser de origem suína ou por um ressortimento natural suíno-humano (MARTELLA et al., 2008).

Na Eslovênia, a análise molecular dos genes VP4, VP7, VP6 e NSP4 de uma cepa de rotavírus humano grupo A demonstrou que esta cepa viral apresentou maior identidade de nt e aa com as cepas virais de rotavírus suíno grupo A. Steyer et al. (2008) propuseram que esta cepa de rotavírus humano grupo A possa ser o resultado da transmissão zoonótica do rotavírus de um suíno para o ser humano.

Na Índia, a análise do genoma completo de uma cepa de rotavírus grupo A G9P[6] revelou a presença de genes provenientes de cepas de RVA humano (VP6 e NSP4) e suíno (VP4 (VP8*), VP1-3, VP7, NSP1-3, NSP5). Os autores sugeriram que esta cepa de rotavírus humano grupo A tenha sido transmitida como um vírus completo do suíno para o ser humano e evoluído com o tempo, ou que esta cepa tenha sofrido vários eventos de ressortimento envolvendo cepas humanas *Wa-like* e suínas P[6]-Id (MUKHERJEE et al., 2009).

Mascarenhas et al. (2007) detectaram em um neonato da cidade de Belém/PA, Brasil, uma cepa de RVA com genes de origem humana e animal (MASCARENHAS et al., 2007). A análise das sequências dos genes VP7 e VP6 da cepa NB-150 demonstrou origem humana. O gene VP7 apresentou 96,9 - 100% de identidade em aa com o genótipo G1 e 97,1 - 100% com o genótipo G4, e quanto à análise do gene VP6, exibiu 95,1 - 97,5% de identidade de aa com cepas humanas. Por outro lado, os genes VP4 (VP8*) e NSP4 exibiram 95% e 93,7 - 96% de identidade de aa, respectivamente, com as cepas de RVA suíno. A cepa agrupou-se na linhagem P[6]-I com 95% de identidade de aa com a sublinhagem Ib suína, entretanto, deu origem a um novo ramo na árvore filogenética e, conseqüentemente, a uma nova sublinhagem, denominada de P[6]-Ie (MASCARENHAS et al., 2007), sustentando a hipótese de transmissão interespecie envolvendo humanos e suínos. Maestri et al. (2012) realizaram a análise do genoma completo (exceto gene NSP2) desta cepa e observaram a presença de outros três genes com maior identidade com cepas de rotavírus suíno grupo A que com cepas humanas.

Na Argentina, foram descritas duas cepas contendo o genotipo G4P[6] e a análise do gene VP4 (VP8*) revelou que as cepas virais apresentavam 92,8% e 96,7% de identidade de nt e aa com as cepas de rotavírus suíno grupo A pertencentes ao P[6]-Ib. Os genes VP7 e NSP4 também apresentaram maior identidade com cepas de rotavírus suíno grupo A. A análise da árvore filogenética possibilitou observar que as cepas pertenciam à linhagem P[6]-I, porém em um ramo distinto, originando a sublinhagem P[6]-If (STUPKA et al., 2009). A análise do genoma completo demonstrou que as duas cepas apresentavam 10 genes de origem suína, entretanto, as duas cepas agruparam em grupos filogenéticos diferentes em 5 dos 11 genes analisados, sugerindo a presença de dois eventos de transmissão interespecie independentes (DEGIUSEPPE et al., 2013).

A análise do genoma completo de duas cepas G9P[19], que foram detectadas em hospedeiros humanos, apresentaram a maioria dos genes, sendo 10 genes na cepa Mc345 e 9 na cepa Mc323, com maior identidade com cepas de rotavírus suíno grupo A. Estas cepas tem estrutura genética do RVA suíno e, provavelmente, sejam de origem suína (GHOSH et al., 2012b). Outras cepas G9P[19] detectadas em humanos também demonstraram evidências de origem suína (VARGHESE et al., 2004; MUKHERJEE et al., 2011).

A análise do genoma completo tem sido conduzida em cepas de rotavírus grupo A de várias espécies animais, como por exemplo, humano (DONG et al., 2013; DO et al., 2014; THEAMBOONLERS et al., 2014), suíno (KIM et al., 2012; MARTEL-PARADIS et al., 2013; OKITSU et al., 2013), bovino (PARK et al., 2011), equino (GHOSH et al., 2012a), aves (TROJNAR et al., 2013), símio, ovino, coelho (MATTHIJNSSENS et al., 2008a, 2008b), canino, felino (MARTELLA et al., 2010) e panda (GUO et al., 2013).

O novo sistema de classificação das cepas de rotavírus grupo A revelou a presença de três constelações de genotipos (genogrupos) para rotavírus humano grupo A, sendo duas grandes e uma pequena. As cepas de rotavírus humano grupo A Wa-like (genogrupo 1) e DS-1-like (genogrupo 2) tem uma origem comum com cepas suínas e bovinas, respectivamente. O genogrupo 3 (pequeno), chamado de AU-1-like, acredita-se diferentemente, que tenha sido originado de cepas de rotavírus de felinos/caninos (MATTHIJNSSENS et al., 2008a). As cepas Wa-like, DS-1-like e AU-1-like apresentam as seguintes constelações de genotipos: G1-P[8]-I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1, G2-P[4]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2 e G3-P[9]-I3-R3-C3-M3-A3-N3-T3-E3-H3, respectivamente (Tabela 3).

A maioria dos genes detectados em cepas de rotavírus suíno grupo A apresentam os genotipos presentes nas cepas Wa-like. As cepas OSU, *Gottfried* e YM apresentam as seguintes configurações de genotipos: G5-P[7]-I5-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1, G4-P[6]-I1-

R1-C1-M1-A8-N1-T1-E1-H1 e G11-P[7]-I5-R1-C1-M1-A8-N1-T1-E1-H1, respectivamente (MATTHIJNSSENS et al., 2010) (Tabela 3). Os genótipos I5 (gene VP6) e A8 (NSP1) são somente descritos em cepas de RVA de suínos e em cepas de RVA humanas ou animais provenientes de transmissão interespecie ou ressortimento (MATTHIJNSSENS et al., 2010; GHOSH et al., 2012a; PAPP et al., 2013a). Estudos que analisaram o genoma completo de cepas de RVA detectadas em hospedeiros humanos (MUKHERJEE et al., 2009, 2011; GHOSH et al., 2012b; MAESTRI et al., 2012; DEGIUSEPPE et al., 2013; DONG et al., 2013; PAPP et al., 2013a; ZELLER et al., 2012; DO et al., 2014), e de outras espécies de animais (PARK et al., 2011; GHOSH et al., 2012a; GUO et al., 2013), relatam a presença de alguns ou da maioria dos genes de origem suína.

Alguns estudos analisaram o genoma completo de cepas de RVA humano G4P[6], demonstrando a presença de genes de origem suína (MUKHERJEE et al., 2011; MAESTRI et al., 2012; DEGIUSEPPE et al., 2013; DONG et al., 2013; PAPP et al., 2013a). Papp et al. (2013a) analisaram o genoma completo de oito cepas de RVA humano G4P[6] provenientes de crianças da Hungria com a constelação de genótipos G4-P[6]-I1/I5-R1-C1-M1-A1/A8-N1-T1/T7-E1-H1, concluindo que estas cepas provavelmente foram originadas por meio de eventos de transmissão zoonótica independentes. Dong et al. (2013) detectaram a presença dos genótipos G4-P[6]-I1-R1-C1-M1-A8-N1-T1-E1-H1, sendo que 9 dos 11 genes foram mais relatados em cepas de RVA de origem suína (Tabela 3).

Tabela 3 - Constelação genômica de cepas de rotavírus grupo A humano e suíno. Os genótipos são representados pela cor verde (genótipo suíno/humano), vermelho (genótipo bovino/humano), azul (genótipo típico suíno) e amarelo (genótipos G4 e P[6]). Genes parcialmente sequenciados estão em itálico.

Cepa	VP7	VP4	VP6	VP1	VP2	VP3	NSP1	NSP2	NSP3	NSP4	NSP5	Referência
RVA/Human-tc/USA/Wa/1974	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1	Matthijnssens et al. (2008a)
RVA/Human-tc/GBR/ST3/1975/G4P2A[6]	G4	P[6]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1	Matthijnssens et al. (2008a)
RVA/Human-wt/HUN/BP1227/2002/G4P[6]	G4	P[6]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1	Papp et al. (2013a)
RVA/Pig-tc/USA/Gottfried/1983/G4P2BP[6]	G4	P[6]	I1	R1	C1	M1	A8	N1	T1	E1	H1	Matthijnssens et al. (2010)
RVA/Pig-wt/BRA/BRA843/2007/G4P[6]	G4	P[6]	I5	<i>R1</i>	<i>C1</i>	<i>M1</i>	A8	N1	T7	E1	H1	Presente estudo
RVA/Human-wt/HUN/BP1547/2005/G4P[6]	G4	P[6]	I5	R1	C1	M1	A8	N1	T7	E1	H1	Papp et al. (2013a)
RVA/Human-wt/HUN/BP271/2000/G4P[6]	G4	P[6]	I1	R1	C1	M1	A8	N1	T7	E1	H1	Papp et al. (2013a)
RVA/Human-wt/ARG/Arg4605/2006/G4P[6]	G4	P[6]	I1	R1	C1	M1	A8	N1	T7	E1	H1	Degiuseppe et al. (2013)
RVA/Human-wt/ARG/Arg4671/2006/G4P[6]	G4	P[6]	I1	R1	C1	M1	A8	N1	T1	E1	H1	Degiuseppe et al. (2013)
RVA/Human-wt/BRA/HSP180/1999/G4P[6]	G4	P[6]	<i>I1</i>	<i>R1</i>	<i>C1</i>	<i>M1</i>	A8	N1	T7	E1	H1	Maestri et al. (2012)
RVA/Human-wt/HUN/BP1490/1994/G4P[6]	G4	P[6]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T7	E1	H1	Papp et al. (2013a)
RVA/Human-tc/CHN/R479/2004/G4P[6]	G4	P[6]	I5	R1	C1	M1	A1	N1	T7	E1	H1	Wang et al. (2010)
RVA/Human-wt/CHN/GX78/2010/G4P[6]	G4	P[6]	I1	R1	C1	M1	A8	N1	T1	E1	H1	Dong et al. (2013)
RVA/Human-wt/IND/mani-362/2007/G4P[6]	G4	P[6]	I1	<i>R1</i>	<i>C1</i>	<i>M1</i>	A8	N1	T1	E1	H1	Mukherjee et al. (2011)
RVA/Pig-tc/USA/OSU/1977/G5P9[7]	G5	P[7]	I5	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1	Matthijnssens et al. (2010)
RVA/Pig-tc/MEX/YM/1983/G11P9[7]	G11	P[7]	I5	R1	C1	M1	A8	N1	T1	E1	H1	Matthijnssens et al. (2010)
RVA/Human-tc/USA/DS-1/1976/G2P[4]	G2	P[4]	I2	R2	C2	M2	A2	N2	T2	E2	H2	Matthijnssens et al. (2008a)

Apesar do suíno ser considerado como potencial reservatório para o rotavírus humano e animal e, com isso, contribuir com a sua diversidade antigênica e genética, ainda são poucos os genomas completos de RVA de origem suína disponíveis em bases públicas de dados (MATTHIJNSSENS et al., 2008a, 2008b, 2010; KIM et al., 2012; MARTEL-PARADIS et al., 2013; OKITSU et al., 2013). Primeiramente foram caracterizados os genomas completos das cepas de rotavírus suíno grupo A G5P[7] (cepa OSU), G11P[7] (cepa YM), G4P[6] (cepa *Gottfried*), G3P[7] (cepa A131) e G11P[7] (cepa A253) (MATTHIJNSSENS et al., 2008a, 2010). Recentemente, outras cepas com diferentes genótipos G e P foram submetidas à caracterização do genoma completo, como por exemplo, a cepa G12P[7] na Índia (GHOSH et al., 2010), as cepas G9P[23] e G9P[7] na Coreia do Sul (KIM et al., 2012), as cepas G3P[23], G3P[13] e G9P[23] na Tailândia (OKITSU et al., 2013) e as cepas G2P[6]/P[7], G2P[34], G9P[7]/P[13] e G11P[13] no Canadá (MARTEL-PARADIS et al., 2013). Todas estas cepas descritas de hospedeiros suínos apresentam genes com maior identidade com cepas de rotavírus suíno grupo A.

A análise do genoma completo de uma cepa de RVA é muito importante para determinar a origem da cepa viral e a possibilidade de eventos de transmissão interespecie,

bem como adicionar informações sobre a evolução deste vírus tão complexo. Por outro lado, Kim et al. (2012) sugeriram que para estudar a possível origem suína de cepas de RVA humanas é necessário ter mais atenção com relação aos genes que codificam as proteínas VP4, VP6, VP7 e NSP1, já que cepas de rotavírus suíno e humano provenientes de transmissão interespecie, apresentam genotipos típicos de suínos nestes genes.

1.6 REFERÊNCIAS

ABIPECS. Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína. Disponível em: <<http://www.abipecs.org.br/>>. Acesso em: 19 fevereiro 2014.

ALFIERI, A.A.; ALFIERI, A.F.; FREITAS, J.C.; SILVA, C.A.; FREIRE, R.L.; BARROS, A.R.; BARREIROS, M.A.B.; MÜLLER, E.E. Ocorrência de *Escherichia coli*, rotavírus, picobirnavírus, e *Cryptosporidium parvum* em um foco de diarreia do pós-desmame em suínos. **Semina: Ciências Agrárias**, v.15, n.1, p.5-7, 1994.

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

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

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

ALFIERI, A.A.; ALFIERI, A.F.; TAKIUCHI, E.; LOBATO, Z.I.P. Reoviridae. In: **Virologia Veterinária**, UFSM editora, Brasil, p.773-807, 2007.

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

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

AMIMO, J.O.; VLASOVA, A.N.; SAIF, L. J. Detection and genetic diversity of porcine group A rotaviruses in historic (2004) and recent (2011 and 2012) swine fecal samples in Ohio: Predominance of the G9P[13] genotype in nursing piglets. **Journal of Clinical Microbiology**, v.51, p.1142-1151, 2013.

BÁNYAI, K.; MARTELLA, V.; JAKAB, F.; MELEGH, B.; SZUCS, G. Sequencing and phylogenetic analysis of human genotype P[6] rotavirus strains detected in Hungary provides evidence for genetic heterogeneity within the P[6] VP4 gene. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, n.9, p. 4338-4343, 2004.

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

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

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

CHAN-IT, W.; KHAMRIN, P.; SAEKHOW, P.; PANTIP, C.; THONGPRACHUM, A.; PEERAKOME, S.; USHIJIMA, H.; MANEEKARN, N. Multiple combinations of P[13]-like genotype with G3, G4, and G5 in porcine rotaviruses. **Journal of Clinical Microbiology**, v.46, p.1169-1173, 2008.

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

CIARLET, M.; LIPRANDI, F. Serological and genomic characterization of two porcine rotaviruses with serotype G1 specificity. **Journal of Clinical Microbiology**, v.32, n.1, p.269-272, 1994.

COLLINS, P.J.; MARTELLA, V.; BUONAVOGLIA, C.; O'SHEA, H. Identification of a G2-like porcine rotavirus bearing a novel VP4 type, P[32]. **Veterinary Research**, v.41, p.73, 2010a.

COLLINS, P.J.; MARTELLA, V.; SLEATOR, R.D.; FANNING, S.; O'SHEA, H. Detection and characterisation of group A rotavirus in asymptomatic piglets in southern Ireland. **Archives of Virology**, v.155, p.1247-1259, 2010b.

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.

DEGIUSEPPE, J.I.; BELTRAMINO, J.C.; MILLÁN, A.; STUPKA, J.A.; PARRA, G.I. Complete genome analyses of G4P[6] rotavirus detected in Argentinean children with diarrhoea provides evidence of interspecies transmission from swine. **Clinical Microbiology and Infection**, v.19, p.E367-E371, 2013.

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

DO, L.P.; NAKAGOMI, T.; NAKAGOMI, O. A rare G1P[6] super-short human rotavirus strain carrying an H2 genotype on the genetic background of a porcine rotavirus. **Infection, Genetics and Evolution**, v.21, p.334-350, 2014.

DONG, H.J.; QIAN, Y.; HUANG, T.; ZHU, R.N.; ZHAO, L.Q.; ZHANG, Y.; LI, R.C.; LI, Y.P. Identification of circulating porcine-human reassortant G4P[6] rotavirus from children

with acute diarrhea in China by whole genome analyses. **Infection, Genetics and Evolution**, v.20, p.155-162, 2013.

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

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

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

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

GHOSH, S.; VARGHESE, V.; SAMAJDAR, S.; BHATTACHARYA, S.K.; KOBAYASHI, N.; NAIK, T.N. Evidence for independent segregation of the VP6- and NSP4- encoding genes in porcine group A rotavirus G6P[13] strains. **Archives of Virology**, v.152, p.423-429, 2007.

GHOSH, S.; KOBAYASHI, N.; NAGASHIMA, S.; CHAWLA-SARKAR, M.; KRISHNAN, T.; GANESH, B.; NAIK, T.N. Full genomic analysis and possible origin of a porcine G12 rotavirus strain RU172. **Virus Genes**, v.40, p.382-388, 2010.

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

GHOSH, S.; URUSHIBARA, N.; TANIGUCHI, K.; KOBAYASHI, N. Whole genomic analysis reveals the porcine origin of human G9P[19] rotavirus strains Mc323 and Mc345. **Infection, Genetics and Evolution**, v.12, p.471-477, 2012b.

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

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

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

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

GUO, L.; YAN, Q.; YANG, S.; WANG, C.; CHEN, S.; YANG, X.; HOU, R.; QUAN, Z.; HAO, Z. Full genome sequence of giant panda rotavirus strain CH-1. **Genome Announcements**, v.1, p.e00241-12, 2013.

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

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

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

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

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

KIM, H.H.; MATTHIJNSSENS, J.; KIM, H.J.; KWON, H.J.; PARK, J.G.; SON, K.Y.; RYU, E.H.; KIM, D.S.; LEE, W.S.; KANG, M.I.; YANG, D.K.; HYUN, B.H.; PARK, S.I.; PARK, S.J.; CHO, K.O. Full-length genomic analysis of porcine G9P[23] and G9P[7] rotavirus strains isolated from pigs with diarrhea in South Korea. **Infection, Genetics and Evolution**, v.12, p.1427-1435, 2012.

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

LINARES, R.C.; BARRY, A.F.; ALFIERI, A.F.; MÉDICI, K.C.; FERONATO, C.; GRIEDER, W.; ALFIERI, A.A. Frequency of group A rotavirus in piglet stool samples from non-vaccinated Brazilian pig herds. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.52, p.63-68, 2009.

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

MAESTRI, R.P.; KAIANO, J.H.L.; NERI, D.L.; SOARES, L.S.; GUERRA, S.F.S.; OLIVEIRA, D.S.; FARIAS, Y.N.; GABBAY, Y.B.; LEITE, J.P.G.; LINHARES, A.C.; MASCARENHAS, J.D.P. Phylogenetic analysis of probable non-human genes of group A rotaviruses isolated from children with acute gastroenteritis in Belém, Brazil. **Journal of Medical Virology**, v.84, p.1993-2002, 2012.

MARTEL-PARADIS, O.; LAURIN, M.A.; MARTELLA, V.; SOHAL, J.S.; L'HOMME, Y. Full-length genome analysis of G2, G9 and G11 porcine group A rotaviruses. **Veterinary Microbiology**, v.162, p.94-102, 2013.

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

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

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

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

MARTELLA, V.; CIARLET, M.; BÁNYAI, K.; LORUSSO, E.; ARISTA, S.; LAVAZZA, A.; PEZZOTTI, G.; DECARO, N.; CAVALLI, A.; LUCENTE, M.S.; CORRENTE, M.; ELIA, G.; CAMERO, M.; TEMPESTA, M.; BUONAVOGLIA, C. Identification of group A porcine rotavirus strains bearing a novel VP4 (P) genotype in Italian swine herds. **Journal of Clinical Microbiology**, v.45, p.577-580, 2007.

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

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

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

MATTHIJNSSENS, J.; CIARLET, M.; HEIMAN, E.; ARIJS, I.; DELBEKE, T.; MCDONALD, S.M.; PALOMBO, E.A.; ITURRIZA-GÓMARA, M.; MAES, P.; PATTON, J.T.; RAHMAN, M.; VAN RANST, M. Full genome-based classification of rotaviruses reveals a common origin between human Wa-like and porcine rotavirus strains and human DS-1-like and bovine rotavirus strains. **Journal of Virology**, v.82, n.7, p.3204-3219, 2008a.

MATTHIJNSSENS, J.; CIARLET, M.; RAHMAN, M.; ATTOUI, H.; BÁNYAI, K.; ESTES, M.K.; GENTSCH, J.R.; ITURRIZA-GÓMARA, M.; KIRKWOOD, C.D.; MARTELLA, V.; MERTENS, P.P.C.; NAKAGOMI, O.; PATTON, J.T.; RUGGERI, F.M.; SAIF, L.J.; SANTOS, N.; STEYER, A.; TANIGUCHI, K.; DESSELBERGER, U.; VAN RANST, M.

Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. **Archives of Virology**, v.153, p.1621-1629, 2008b.

MATTHIJNSSENS, J.; RAHMAN, M.; CIARLET, M.; ZELLER, M.; HEYLEN, E.; NAKAGOMI, T.; UCHIDA, R.; HASSAN, Z.; AZIM, T.; NAKAGOMI, O.; VAN RANST, M. Reassortment of human rotavirus gene segments into G11 rotavirus strains. **Emerging Infectious Diseases**, v.16, p.625-630, 2010.

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

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

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

MÉDICI, K.C.; BARRY, A.F.; ALFIERI, A.F.; ALFIERI, A.A. Porcine rotavirus groups A, B, and C identified by polymerase chain reaction in a fecal sample collection with inconclusive results by polyacrylamide gel electrophoresis. **Journal of Swine Health and Production**, v.19, n.3, p.146-150, 2011.

MIYAZAKI, A.; KUGA, K.; SUZUKI, T.; KOHMOTO, M.; KATSUDA, K.; TSUNEMITSU, H. Genetic diversity of group A rotaviruses associated with repeated outbreaks of diarrhea in a farrow-to finish farm: Identification of a porcine rotavirus strain bearing a novel VP7 genotype, G26. **Veterinary Research**, v.42, p.112, 2011.

MIYAZAKI, A.; KUGA, K.; SUZUKI, T.; TSUNEMITSU, H. Analysis of the excretion dynamics and genotypic characteristics of rotavirus A during the lives of pigs raised on farms for meat production. **Journal of Clinical Microbiology**, v.50, p.2009-2017, 2012.

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

MUKHERJEE, A.; GHOSH, S.; BAGCHI, P.; DUTTA, D.; CHATTOPADHYAY, S.; KOBAYASHI, N.; CHAWLA-SARKAR, M. Full genomic analyses of human rotavirus G4P[4], G4P[6], G9P[19] and G10P[6] strains from north-eastern India: Evidence for interspecies transmission and complex reassortment events. **Clinical Microbiology and Infection**, v.17, p.1343-1346, 2011.

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

NAKAGOMI, T.; HORIE, Y.; KOSHIMURA, Y.; GREENBERG, H.B.; NAKAGOMI, O. Isolation of a human rotavirus strain with a super-short RNA pattern and a new P2 Subtype. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, n.4, p.1213-1216, 1999.

OKADERA, K.; ABE, M.; ITO, N.; MORIKAWA, S.; YAMASAKI, A.; MASATANI, T.; NAKAGAWA, K.; YAMAOKA, S.; SUGIYAMA, M. Evidence of natural transmission of group A rotavirus between domestic pigs and wild boars (*Sus scrofa*) in Japan. **Infection, Genetics and Evolution**, v.20, p.54-60, 2013.

OKITSU, S.; KHAMRIN, P.; THONGPRACHUM, A.; KONGKAEW, A.; MANEEKARN, N.; MIZUGUCHI, M.; HAYAKAWA, S.; USHIJIMA, H. Whole-genomic analysis of G3P[23], G9P[23] and G3P[13] rotavirus strains isolated from piglets with diarrhea in Thailand, 2006–2008. **Infection, Genetics and Evolution**, v.18, p.74-86, 2013.

OTTO, P.H.; AHMED, M.U.; HOTZEL, H.; MACHNOWSKA, P.; REETZ, J.; ROTH, B.; TROJNAR, E.; JOHNE, R. Detection of avian rotaviruses of groups A, D, F and G in diseased chickens and turkeys from Europe and Bangladesh. **Veterinary Microbiology**, v.156, p.8-15, 2012.

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

PAPP, H.; AL-MUTAIRI, L.Z.; CHEHADEH, W.; FARKAS, S.L.; LENGYEL, G.; JAKAB, F.; MARTELLA, V.; SZÚCS, G.; BÁNYAI, K. Novel NSP4 Genotype in a camel G10P[15] rotavirus strain. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, v. 59, p.411-421, 2012.

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

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

PARASHAR, U.D.; HUMMELMAN, E.G.; BRESEE, J.S.; MILLER, M.A.; GLASS, R.I. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children emerging infectious diseases. **Emerging Infectious Diseases**, v.9, n.5, p.565-572, 2003.

PARK, S.I.; MATTHIJNSSENS, J.; SAIF, L.J.; KIM, H.J.; PARK, J.G.; ALFAJARO, M.M.; KIM, D.S.; SON, K.Y.; YANG, D.K.; HYUN, B.H.; KANG, M.I.; CHO, K.O. Reassortment among bovine, porcine and human rotavirus strains results in G8P[7] and G6P[7] strains isolated from cattle in south Korea. **Veterinary Microbiology**, v.152, p.55-66, 2011.

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

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

PEDLEY, S.; BRIDGER, J.C.; CHASEY, D.; MCCRAE, M.A. Definition of two new groups of atypical rotaviruses. **Journal of General Virology**, v.67, p.131-137, 1986.

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

RÁCZ, M.L.; KROEFF, S.S.; MUNFORD, V.; CARUZO, T.A.R.; DURIGON, E.L.; HAYASHI, Y.; GOUVEA, V.; PALOMBO, E.A. Molecular characterization of porcine rotaviruses from the southern region of Brazil: Characterization of an atypical genotype G [9] strain. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, n.6, p.2443-2446, 2000.

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

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

SAIKRUANG, W.; KHAMRIN, P.; CHAIMONGKOL, N.; SUANTAI, B.; KONGKAEW, A.; KONGKAEW, S.; USHIJIMA, H.; MANEEKARN, N. Genetic diversity and novel combinations of G4P[19] and G9P[19] porcine rotavirus strains in Thailand. **Veterinary Microbiology**, v.161, p.255-262, 2013.

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

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

SILVA, C.A.; BRITO, B.G.; MORES, N.; AMARAL, A.L. Fatores de risco relacionados com o desempenho de leitões lactentes em granjas de suínos da região norte do Paraná. **Ciência Rural**, v.28, n.4, p.677-681, 1998.

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

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

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

THEAMBOONLERS, A.; BHATTARAKOSOL, P.; CHONGSRISAWAT, V.; SUNGKAPALEE, T.; WUTTHIRATTANAKOWIT, N.; POOVORAWAN, Y. Molecular characterization of group A human rotaviruses in Bangkok and Buriram, Thailand during 2004–2006 reveals the predominance of G1P[8], G9P[8] and a rare G3P[19] strain. **Virus Genes**, v.36, p.289-298, 2008.

THEAMBOONLERS, A.; MAIKLANG, O.; THONGMEE, T.; CHIEOCHANSIN, T.; VUTHITANACHOT, V.; POOVORAWAN, Y. Complete genotype constellation of human rotavirus group A circulating in Thailand, 2008–2011. **Infection, Genetics and Evolution**, v.21, p.295-302, 2014.

TONIETTI, P.O.; HORA, A.S.; SILVA, F.D.F.; RUIZ, V.L.A.; GREGORI, F. Phylogenetic analyses of the VP4 and VP7 genes of porcine group A rotaviruses in São Paulo state, Brazil: First identification of G5P[23] in piglets. **Journal of Clinical Microbiology**, v.51, p.2750-2753, 2013.

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

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

VARGHESE, V.; DAS, S.; SINGH, N.B.; KOJIMA, K.; BHATTACHARYA, S.K.; KRISHNAN, T.; KOBAYASHI, N.; NAIK, T.N. Molecular characterization of a human rotavirus reveals porcine characteristics in most of the genes including VP6 and NSP4. **Archives of Virology**, v.149, p.155-172, 2004.

WANG, Y.H.; KOBAYASHI, N.; NAGASHIMA, S.; ZHOU, X.; GHOSH, S.; PENG, J.S.; HU, Q.; ZHOU, D.J.; YANG, Z.Q. Full genomic analysis of a porcine–bovine reassortant G4P[6] rotavirus strain R479 isolated from an infant in China. **Journal of Medical Virology**, v.82, p.1094-1102, 2010.

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

ZELLER, M.; HEYLEN, E.; COSTER, S.; VAN RANST, M.; MATTHIJNSSENS, J. Full genome characterization of a porcine-like human G9P[6] rotavirus strain isolated from an infant in Belgium. **Infection, Genetics and Evolution**, v.12, p.1492-1500, 2012.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Caracterização molecular de cepas de rotavírus suíno grupo A identificadas em leitões com diarreia em rebanhos suínos brasileiros.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar, por meio de sequenciamento dos produtos da RT-PCR, os genótipos G (gene VP7) e P (gene VP4) em duas cepas (BRA381 e BRA382) de RVA suíno selecionadas por apresentarem resultados negativos em testes de genotipagem utilizando *primers* genótipo-específico para os principais protótipos de RVA de origem humana e animal (bovino e suíno);
- Caracterizar todos os genes da cepa BRA843 de RVA suíno genótipo G4-IX P[6]-If identificada em estudos anteriores como distinta do protótipo suíno G4P[6] (cepa *Gottfried*);
- Realizar análises filogenéticas para a definição dos genótipos R (VP1), C (VP2), M (VP3), I (VP6), A (NSP1), N (NSP2), T (NSP3), E (NSP4) e H (NSP5/6) presentes na cepa brasileira BRA843 de RVA suíno;
- Estudar as relações filogenéticas dos genótipos R, C, M, I, A, N, T, E e H identificados na cepa BRA843 e comparar com cepas virais de origem humana e suína identificadas em todo o mundo e disponíveis em bases públicas de dados.

3. ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO

3.1 First detection of an uncommon genotype combination (G26P[13]) of porcine group A rotavirus

Artigo redigido sob as normas de publicação do periódico *Veterinary Microbiology*, disponível em: <http://www.elsevier.com/journals/veterinary-microbiology/0378-1135/guide-for-authors>.

SHORT COMMUNICATION

First detection of an uncommon genotype combination (G26P[13]) of porcine group A rotavirus

Abstract

Porcine group A rotavirus (RVA) is the main viral cause of neonatal diarrhea in piglets worldwide. The most common combinations of G and P genotypes in RVA strains in piglets are G5P[7] (OSU strain), G4P[6] (Gottfried strain), G3P[7] (CRW8 strain), and G11P[7] (YM strain). However, several other combinations of G and P genotypes have been detected in piglets. This report describes the identification of the G26 genotype in wild-type porcine RVA strains from Brazil and its combination with the P[13] genotype. Two diarrheic fecal samples (BRA381 and BRA382) that were RVA-positive by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) were submitted for RT-PCR analyses of the VP7 (G genotype) and VP4 (VP8* - P genotype) genes. The RT-PCR products were submitted for nucleotide (nt) sequence analysis to identify the G and P genotypes. The VP7 gene of both porcine RVA field strains displayed high nt identity (94.6% to 94.7%) with the G26 porcine strains. The VP4 (VP8*) gene of one strain exhibited 83.5% to 96.3% nt identity with the P[13] porcine strains, and another porcine RVA strain carried an untypeable P genotype. Based on the sequence analysis of the VP7 and VP4 (VP8*) genes, the two porcine field strains (BRA381 and BRA382) belong to the genotypes G26P[13] and G26P[X], respectively. This is the first description of the porcine G26 genotype in diarrheic piglets outside Asia and is also the first detection of the uncommon combination G26P[13] genotype in porcine RVA strains.

Keywords: piglet, diarrhea, RVA, G26 genotype.

1. Introduction

Group A rotavirus (RVA) is one of the major causes of severe diarrhea in young children and animals (Estes and Kapikian, 2007). Rotaviruses are members of the *Rotavirus* genus, which belongs to the *Reoviridae* family, and their genome consists of 11 segments of double-stranded RNA (dsRNA) enclosed in a triple-layered capsid. The segments encode six structural (VP1-VP4 and VP6-VP7) and six non-structural proteins (NSP1-NSP5/6) (Estes and Kapikian, 2007).

The two outer capsid proteins, VP7 and VP4, independently elicit neutralizing antibodies and are used to classify the rotavirus into G (glycoprotein) and P (protease-sensitive) types, respectively (Estes and Kapikian, 2007). Thus far, 27 G genotypes and 37 P genotypes have been described in RVA strains identified in humans and animals (Matthijssens et al., 2011; Trojnar et al., 2013).

Rotaviruses G3, G4, G5, and G11 are the most common G genotypes identified in pigs and are usually associated with P[6] and P[7] genotypes (Winiarczyk et al., 2002; Barreiros et al., 2003; Lorenzetti et al., 2011; Papp et al., 2013). The four main combinations of G and P genotypes in porcine RVA strains are G5P[7] (OSU strain), G4P[6] (Gottfried strain), G11P[7] (YM strain), and G3P[7] (CRW8 strain) (Winiarczyk et al., 2002; Barreiros et al., 2003; Papp et al., 2013).

In addition, other G and P genotypes, such as G1, G2, G6, G8, G9, G10, G12, G26, P[1], P[2], P[3], P[4], P[5], P[8], P[9], P[11], P[13], P[19], P[22], P[23], P[26], P[27], P[32], and P[34] have been identified in pigs (Matthijssens et al., 2011; Miyazaki et al., 2011; Papp et al., 2013). Interspecies transmission and genetic reassortment between human and animal rotaviruses have been frequently described, and pigs are considered as important reservoir for the genetic and antigenic diversity of human RVA strains (Martella et al., 2010).

The porcine G26 genotype was recently described in a five-day-old piglet with diarrhea in the Miyazaki prefecture, Japan (TJ4-1 strain; accession number: AB605258) (Miyazaki et al., 2011), and also in a pig from Hebei Lulong, China (Z650 strain; accession number: KC292205) (Li, 2013, unpublished data). Thus far, the G26 genotype of porcine RVA was only detected in piglets from Asia.

The porcine P[13] genotype has been identified in combination with several G genotypes worldwide, such as G2, G3, G4, G5, G6, G9, and G11 (Ghosh et al., 2007; Collins et al., 2010; Miyazaki et al., 2012; Papp et al., 2013; Saikruang et al., 2013). The P[13] genotype has also been detected in piglets from Brazilian pig herds in combination with the G3 and G9 genotypes of porcine RVA strains (Tonietti et al., 2013).

This report describes the uncommon association of the G26 genotype with the P[13] genotype in diarrheic piglets from Brazil.

2. Materials and methods

2.1 Fecal samples

During a retrospective genotyping study (Lorenzetti et al., manuscript in preparation) of fecal samples previously characterized as RVA-positive by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) (4-2-3-2 pattern), two diarrheic fecal samples (BRA381 and BRA382) collected in July 2012 from suckling (14-28 days old) piglets from a pig farm located in the state of Rio Grande do Sul, Southern Brazil were selected. This pig herd had a complete cycle with 1,800 sows, good nutritional and health management practices, including the all-in/all-out system, and a RVA vaccination program was not used as a prophylactic measure against neonatal diarrhea.

2.2 dsRNA extraction and RT-PCR assay

The nucleic acid extraction of fecal samples was performed using a combination of phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1) and silica/guanidinium isothiocyanate nucleic acid extraction methods (Alfieri et al., 2006). The VP7 (G genotype) and VP4 (VP8* - P genotype) genes were amplified using a RT-PCR assay with consensus primers that amplified 1,062 bp (Gouvea et al., 1990) and 876 bp (Gentsch et al., 1992) products, respectively. The RT-PCR products were analyzed by electrophoresis on a 1.5% agarose gel, which was stained with ethidium bromide and visualized under UV light.

2.3 Sequencing and phylogenetic analysis

The RT-PCR products of the two porcine RVA field strains were purified using the GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK), quantified in a Qubit Fluorometer (Invitrogen Life Technologies, Eugene, OR, USA) and sequenced in an ABI3500 Genetic Analyzer sequencer using a BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The resulting sequences were submitted to the automated online rotavirus genotyping tool, RotaC^{2.0} (Maes et al., 2009). The nucleotide sequences were compared to sequences in GenBank by the BLAST software (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). The nucleotide (nt) identity matrices were constructed by the BioEdit software version 7.1.3.0, and the phylogenetic trees based on the nt sequences were constructed by the neighbor-joining method and the Kimura two-parameter model in MEGA software version 5.05. Bootstrapping was statistically supported with 1,000 replicates.

2.4 Nucleotide sequence accession numbers

The nucleotide sequences described in the present study were deposited in the GenBank database under the following accession numbers: XXXX to XXXX.

3. Results

The RT-PCR assay of the RVA VP7 and VP4 (VP8*) genes from the two diarrheic fecal samples resulted in amplified products of the expected lengths. The RotaC^{2.0} automated genotyping tool for group A rotaviruses and the BLAST searches demonstrated that the BRA381 and BRA382 porcine RVA strains belonged to the G26 genotype, and the BRA381 strain belonged to the P[13] genotype.

Comparative sequence analysis of the VP7 gene and the 27 known G genotypes revealed that the two wild-type porcine RVA strains from Brazil (BRA381 and BRA382) presented 94.7% nt sequence identity with the porcine prototype of the G26 genotype (TJ4-1 strain) and 94.6% nt identity with another porcine G26 genotype strain, Z650. The VP7 nt sequences of the two Brazilian wild-type porcine strains exhibited 100% nt identity with each other and 60.7% to 79.7% nt identity with other G genotypes strains. In the phylogenetic tree, the porcine field strains described in this study clustered with the G26 genotype strains (Figure 1). In the BLAST analysis, both porcine RVA strains herein described exhibited 94% nt similarity with an uncommon G3P[19] human RVA strain, named 57vp7W.

Comparison of the VP4 (VP8*) gene with the 37 known P genotypes revealed that the wild-type porcine strain from Brazil (BRA381) showed 84.4% nt identity with the prototype of the P[13] genotype (HP140 strain), 83.5% to 96.3% nt identity with other representative strains of the P[13] genotype, 79.4% to 81.2% nt identity with P[13]/P[22] porcine strains, and 44.7% to 76.9% nt identity with other P genotypes strains. The BRA381 strain exhibited elevated nt identity (96.3%) with the PGRV19 porcine strain from Brazil. In the phylogenetic

tree, the Brazilian wild-type porcine strain grouped in the same branch as two Japanese porcine strains (FGP36 and pig9-112d) and one Brazilian porcine strain (PGRV19) within the P[13] genotype cluster (Figure 2). The P genotype of the other porcine field strain described (BRA382) remained untypeable.

4. Discussion

The two wild-type porcine RVA strains from Brazil described in the present study exhibited high nt identity and clustered with the prototype G26 genotype (TJ4-1 strain - AB605258) in the phylogenetic tree (Miyazaki et al., 2011). This porcine genotype was recently identified in a five-day-old diarrheic piglet in the Miyazaki prefecture, Japan (Miyazaki et al., 2011), and later was detected in a pig from Hebei Lulong, China (Z650 strain - KC292205) (Li, 2013, unpublished data). These findings might represent the first description of the G26 genotype in piglets within the America. This genotype was only described in piglets from Asia (Miyazaki et al., 2011).

In this study, the G26 genotype was identified in two diarrheic fecal samples from 14 to 28 day-old piglets. Miyazaki et al. (2011) identified this genotype in a diarrheic fecal sample from a five-day-old piglet. Furthermore, this genotype has only been detected in non-vaccinated suckling piglets with diarrhea.

Pigs are regarded as a potential reservoir for the genetic and antigenic diversity of human RVA strains. Interspecies transmission and genetic reassortment involving human and animal rotaviruses are continuously found, and these events can contribute to human rotavirus diversification (Martella et al., 2010). The 57vp7W human RVA strain identified in Thailand belongs to an uncommon G and P combination G3P[19], however it is more similar to the G26 genotype porcine RVA strains (Theamboonlers et al., 2008; Miyazaki et al., 2011). Miyazaki et al. (2011) suggested that the human strain 57vp7W may be considered a porcine-

human reassortment or a porcine strain and that the G26 genotype can be found in human hosts. The human RVA strain (57vp7W) presented 94% nt similarity with the Brazilian porcine strains reported in this study.

The G26 genotype was first detected in combination with the porcine P[7] genotype (Miyazaki et al., 2011), which is the most prevalent P genotype found in piglets (Miyazaki et al., 2012; Papp et al., 2013). In this study, one G26 porcine strain was identified in combination with the porcine P[13] genotype (BRA381 strain); this is the third most prevalent P genotype in piglets (Papp et al., 2013). The BRA382 strain was positive for RVA (P genotype) by RT-PCR, but the nt sequence could not be established despite several attempts.

The P[13] genotype is commonly identified among pigs (restricted host) worldwide and has not been identified from other animal hosts or humans (Ghosh et al., 2007; Collins et al., 2010; Miyazaki et al., 2012; Amimo et al., 2013). This porcine P genotype has been detected with the G genotypes G2, G3, G4, G5, G6, G9, and G11 (Papp et al., 2013) and has already been identified in Europe (Collins et al., 2010), Asia (Ghosh et al., 2007; Chan-it et al., 2008; Saikruang et al., 2013), Oceania (Huang et al., 1993), at North (Amimo et al., 2013), and South America (Tonietti et al., 2013). P[13] RVAs have been found in domestic pigs but have also been identified in a wild boar with the G9 genotype in Japan (Okadera et al., 2013). In Brazil, the P[13] genotype strains have been described in combination with the G3 and G9 genotypes (Tonietti et al., 2013). This is the first description of the G26P[13] combination in RVA strains worldwide.

The BRA381 strain was detected in a pig farm in the state of Rio Grande do Sul, Southern Brazil and presented high (96.3%) nt identity with a P[13] strain detected in a fecal sample from a pig farm in São Paulo state, Southeast Brazil (Tonietti et al., 2013). These

findings show that the P[13] genotype is circulating in these regions of Brazil, both of which are considered important pork producing regions.

The continuous monitoring and identification of new G and P genotypes or uncommon combinations of G and P genotypes of the porcine RVA strains provides information relative to the circulation and diversity of RVA in piglets. This is important for animal and public health, as piglets are considered as potential reservoir for the diversity of human RVA strains.

This study demonstrates the identification of the G26 genotype circulating in a pig farm from Brazil, revealing the diversity of G and P genotypes of porcine RVA strains in this country. To the best of our knowledge, this is the first detection of the G26 genotype in Brazilian pig herds and outside of the Asian continent. This is also the first report of this genotype in combination with the P[13] genotype.

References

- Amimo, J.O., Vlasova, A.N., Saif, L.J., 2013. Detection and genetic diversity of porcine group A rotaviruses in historic (2004) and recent (2011 and 2012) swine fecal samples in Ohio: Predominance of the G9P[13] genotype in nursing piglets. *J. Clin. Microbiol.* 51, 1142–1151.
- Alfieri, A.A., Parazzi, M.E., Takiuchi, E., Médici, K.C., Alfieri, A.F., 2006. Frequency of group A rotavirus in diarrhoeic calves in Brazilian cattle herds, 1998-2002. *Trop. Anim. Health Prod.* 38, 521–526.
- Barreiros, M.A.B., Alfieri, A.A., Alfieri, A.F., Médici, K.C., Leite, J.P.G., 2003. An outbreak of diarrhoea in one-week-old piglets caused by group A rotavirus genotypes P[7],G3 and P[7],G5. *Vet. Res. Commun.* 27, 505–512.
- Chan-it, W., Khamrin, P., Saekhow, P., Pantip, C., Thongprachum, A., Peerakome, S., Ushijima, H., Maneekarn, N., 2008. Multiple combinations of P[13]-like genotype with G3, G4, and G5 in porcine rotaviruses. *J. Clin. Microbiol.* 46, 1169–1173.
- Collins, P.J., Martella, V., Sleator, R.D., Fanning, S., O’Shea, H., 2010. Detection and characterisation of group A rotavirus in asymptomatic piglets in southern Ireland. *Arch. Virol.* 155, 1247–1259.

Estes, M.K., Kapikian, A.Z., 2007. Rotaviruses. In: Knipe, D.M., Howley, P.M., Griffin, D.E., Lamb, R.A., Martin, M.A., Roizman, B., Straus, S.E. (Eds.), *Fields Virology*, 5th ed., vol.2. Lippincott, Williams & Wilkins/Wolters Kluwer, Philadelphia, PA, pp. 1917–1974.

Gentsch, J.R., Glass, R.I., Woods, P., Gouvea, V., Gorziglia, M., Flores, J., Das, B.K., Bhan, M.K., 1992. Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 30, 1365–1373.

Ghosh, S., Varghese, V., Samajdar, S., Bhattacharya, S.K., Kobayashi, N., Naik, T.N., 2007. Evidence for independent segregation of the VP6- and NSP4- encoding genes in porcine group A rotavirus G6P[13] strains. *Arch. Virol.* 152, 423–429.

Gouvea, V., Glass, R.I., Woods, P., Taniguchi, K., Clark, H.F., Forrester, B., Fang, Z.Y., 1990. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *J. Clin. Microbiol.* 28, 276–282.

Huang, J.A., Nagesha, H.S., Holmes, I.H., 1993. Comparative sequence analysis of VP4s from five Australian porcine rotaviruses: Implication of an apparent new P type. *Virology* 196, 319–327.

Lorenzetti, E., Medeiros, T.N.S., Alfieri, A.F., Alfieri, A.A., 2011. Genetic heterogeneity of wild-type G4P[6] porcine rotavirus strains detected in a diarrhea outbreak in a regularly vaccinated pig herd. *Vet. Microbiol.* 154, 191–196.

Maes, P., Matthijnsens, J., Rahman, M., Van Ranst, M., 2009. RotaC: A web-based tool for the complete genome classification of group A rotaviruses. *BMC Microbiol.* 9, 238.

Martella, V., Bányai, K., Matthijnsens, J., Buonavoglia, C., Ciarlet, M., 2010. Zoonotic aspects of rotaviruses. *Vet. Microbiol.* 140, 246–255.

Matthijnsens, J., Ciarlet, M., McDonald, S.M., Attoui, H., Bányai, K., Brister, J.R., Buesa, J., Esona, M.D., Estes, M.K., Gentsch, J.R., Iturriza-Gómara, M., Johne, R., Kirkwood, C.D., Martella, V., Mertens, P.P., Nakagomi, O., Parreño, V., Rahman, M., Ruggeri, F.M., Saif, L.J., Santos, N., Steyer, A., Taniguchi, K., Patton, J.T., Desselberger, U., Van Ranst, M., 2011. Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the rotavirus classification working group (RCWG). *Arch. Virol.* 156, 1397–1413.

Miyazaki, A., Kuga, K., Suzuki, T., Kohmoto, M., Katsuda, K., Tsunemitsu, H., 2011. Genetic diversity of group A rotaviruses associated with repeated outbreaks of diarrhea in a farrow-to finish farm: Identification of a porcine rotavirus strain bearing a novel VP7 genotype, G26. *Vet. Res.* 42, 112.

Miyazaki, A., Kuga, K., Suzuki, T., Tsunemitsu, H., 2012. Analysis of the excretion dynamics and genotypic characteristics of rotavirus A during the lives of pigs raised on farms for meat production. *J. Clin. Microbiol.* 50, 2009–2017.

Okadera, K., Abe, M., Ito, N., Morikawa, S., Yamasaki, A., Masatani, T., Nakagawa, K., Yamaoka, S., Sugiyama, M., 2013. Evidence of natural transmission of group A rotavirus between domestic pigs and wild boars (*Sus scrofa*) in Japan. *Infect. Genet. Evol.* 20, 54–60.

Papp, H., László, B., Jakab, F., Ganesh, B., De Grazia, S., Matthijssens, J., Ciarlet, M., Martella, V., Bányai, K., 2013. Review of group A rotavirus strains reported in swine and cattle. *Vet. Microbiol.* 165, 190–199.

Saikruang, W., Khamrin, P., Chaimongkol, N., Suantai, B., Kongkaew, A., Kongkaew, S., Ushijima, H., Maneekarn, N., 2013. Genetic diversity and novel combinations of G4P[19] and G9P[19] porcine rotavirus strains in Thailand. *Vet. Microbiol.* 161, 255–262.

Theamboonlers, A., Bhattarakosol, P., Chongsrisawat, V., Sungkapalee, T., Wutthirattanakowit, N., Poovorawan, Y., 2008. Molecular characterization of group A human rotaviruses in Bangkok and Buriram, Thailand during 2004–2006 reveals the predominance of G1P[8], G9P[8] and a rare G3P[19] strain. *Virus Genes* 36, 289–298.

Tonietti, P.O., Hora, A.S., Silva, F.D.F., Ruiz, V.L.A., Gregori, F., 2013. Phylogenetic analyses of the VP4 and VP7 genes of porcine group A rotaviruses in São Paulo state, Brazil: First identification of G5P[23] in piglets. *J. Clin. Microbiol.* 51, 2750–2753.

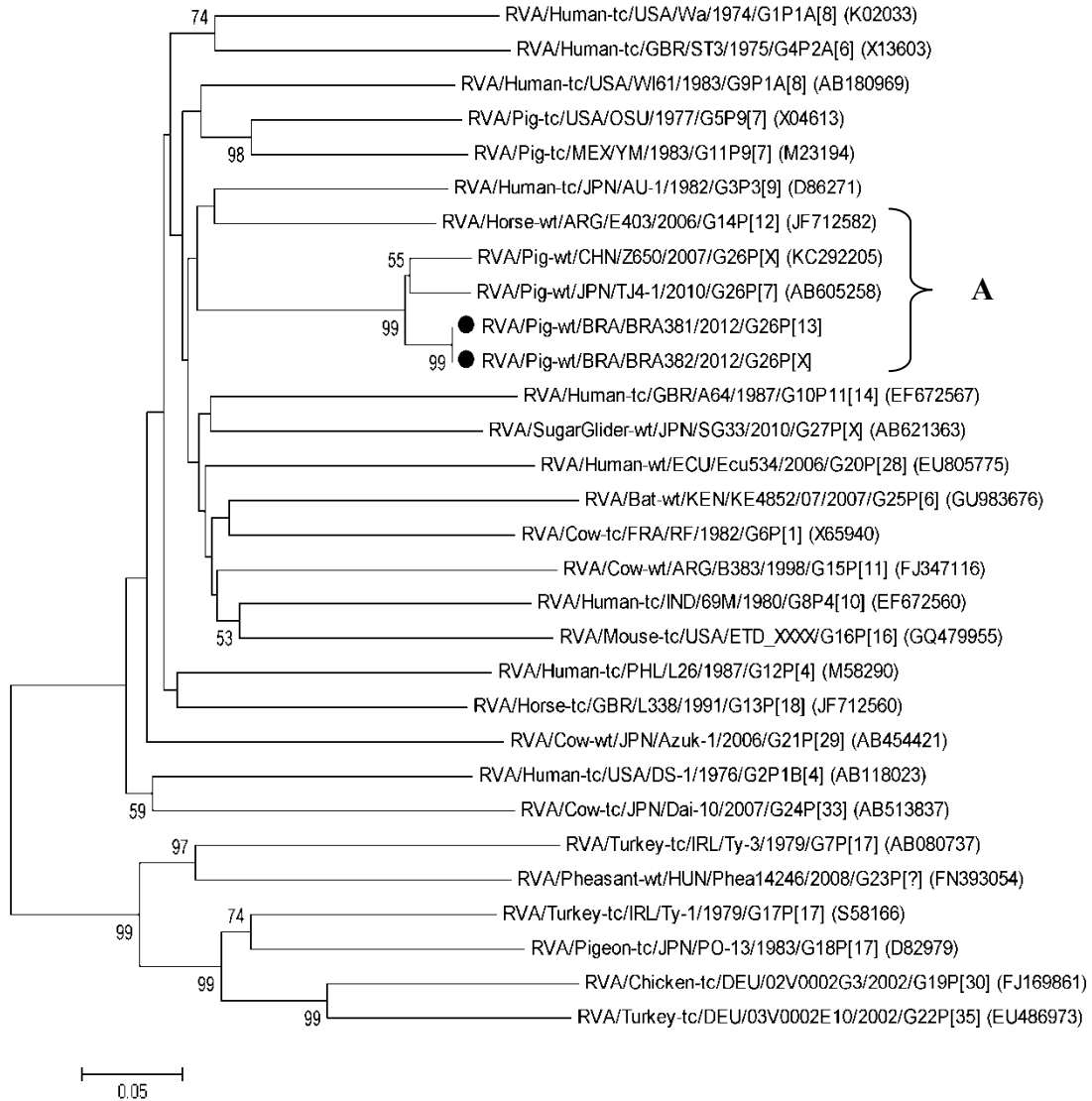
Trojnar, E., Sachsenröder, J., Twardziok, S., Reetz, J., Otto, P.H., Johne, R., 2013. Identification of an avian group A rotavirus containing a novel VP4 gene with a close relationship to those of mammalian rotaviruses. *J. Gen. Virol.* 94, 136–142.

Winiarczyk, S., Paul, P.S., Mummidi, S., Panek, R., Gradzki, Z., 2002. Survey of porcine rotavirus G and P genotype in Poland and the United States using RT-PCR. *J. Vet. Med. B* 49, 373–378.

Figure 1. Phylogenetic tree based on the partial nucleotide sequences of the VP7 gene from the porcine RVA strains described in this study and representative strains of the 27 genotypes recognized thus far. The tree was constructed using the neighbor-joining method and the Kimura two-parameter model for nucleotide substitution. The bootstrap values are shown at the branch nodes (values <50% are not shown). The scale bars at the bottom of the trees represents nucleotide substitutions per site. Tree for the G26 strains (A). GenBank accession numbers of the reference strains are indicated between parentheses. The Brazilian porcine RVA strains are marked with a filled circle.

Figure 2. Phylogenetic tree based on the partial nucleotide sequences of the VP4 (VP8*) gene from the porcine RVA strains described in this study, representative strains of the 37 genotypes recognized thus far, and representative strains of the P[13] genotype. The tree was constructed using the neighbor-joining method and the Kimura two-parameter model for nucleotide substitution. The bootstrap values are shown at the branch nodes (values <50% are not shown). The scale bars at the bottom of the trees represents nucleotide substitutions per site. Tree for the P[13] strains (A). GenBank accession numbers of the reference strains are indicated between parentheses. The Brazilian porcine RVA strain is marked with a filled circle.

Figure 1



A)

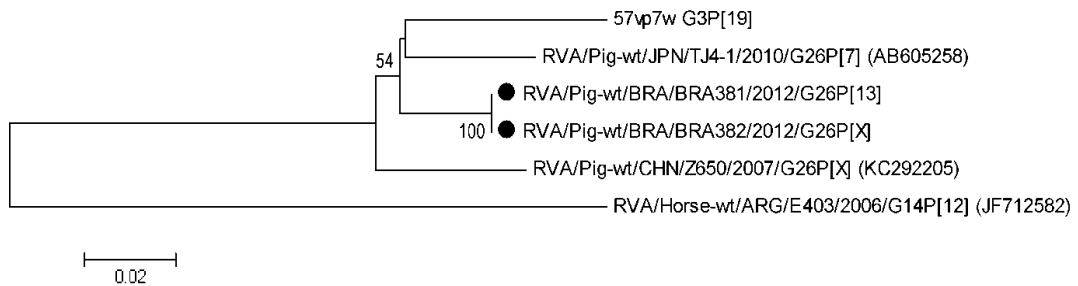
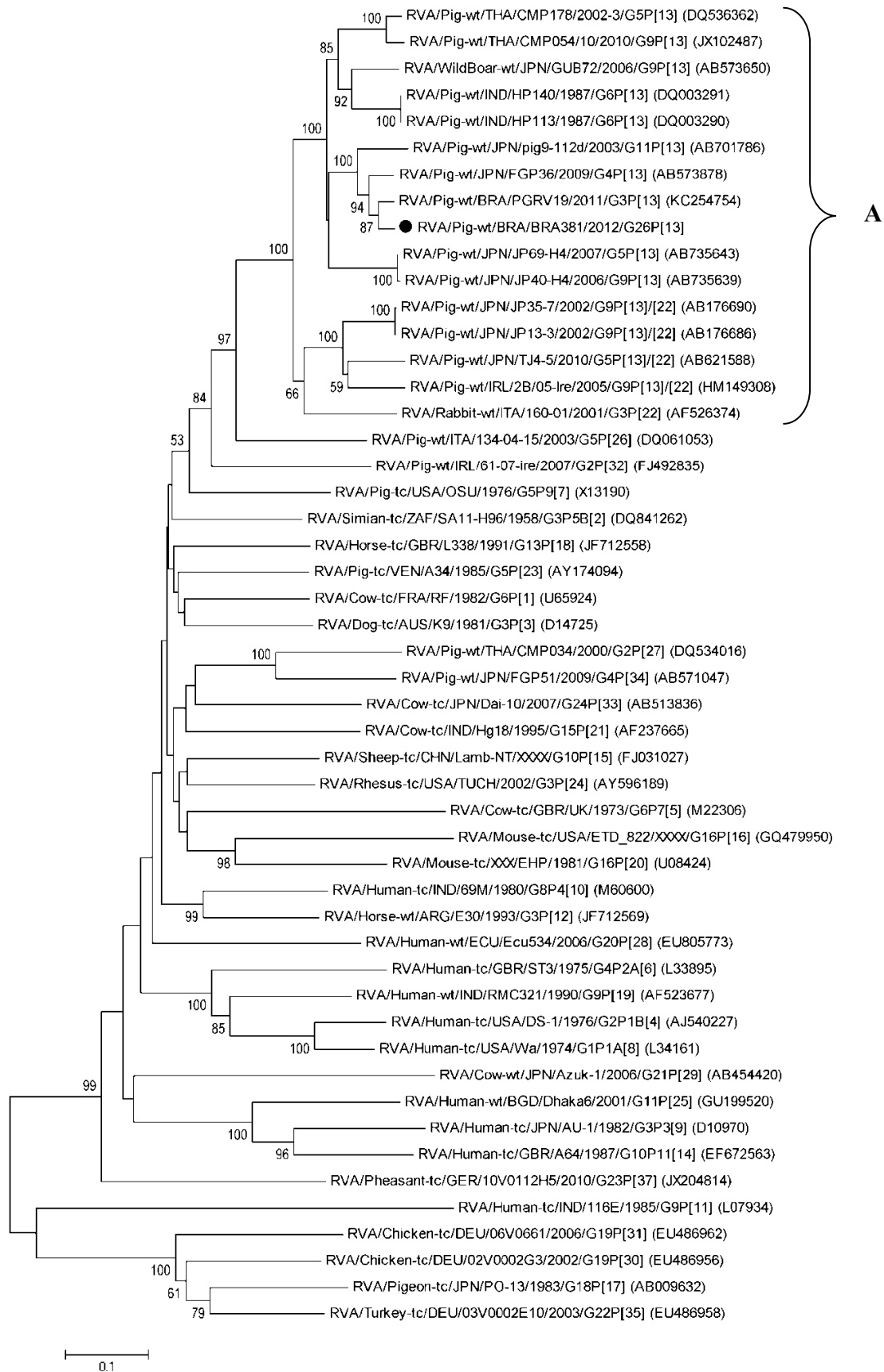
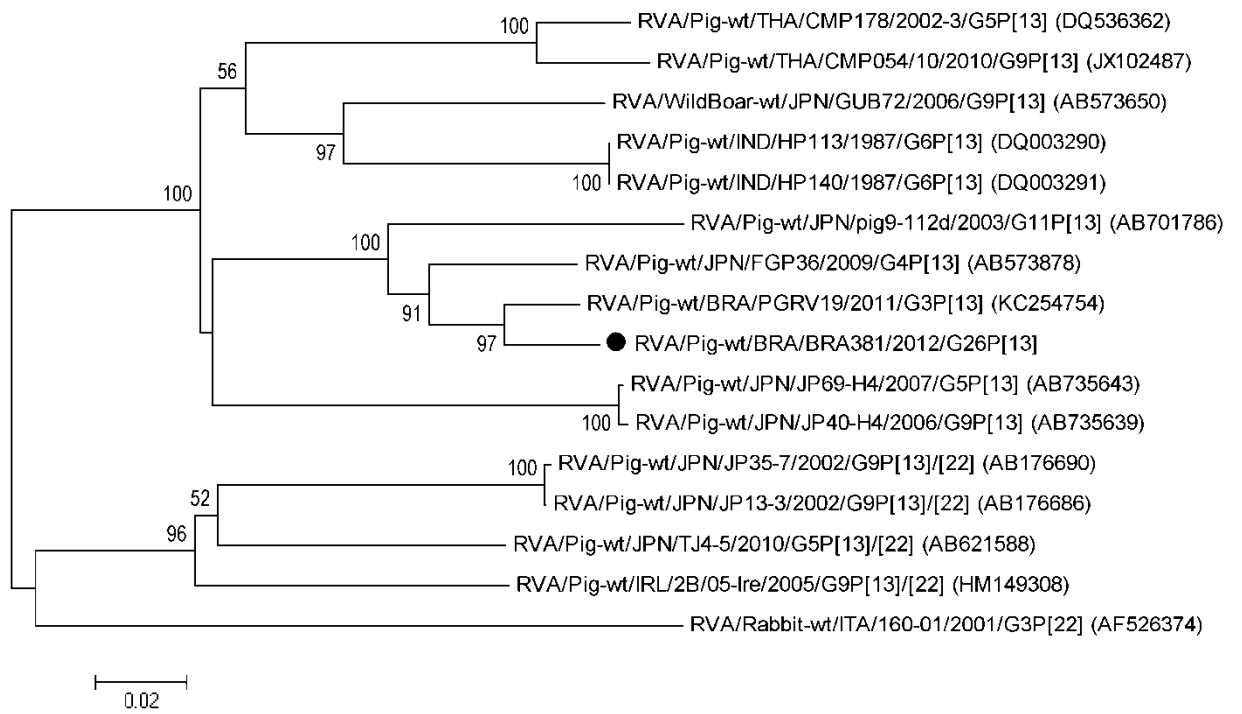


Figure 2



A)



3.2 Genomic analysis of G4P[6] porcine group A rotavirus

Artigo redigido sob as normas de publicação do periódico *Veterinary Microbiology*, disponível em: <http://www.elsevier.com/journals/veterinary-microbiology/0378-1135/guide-for-authors>.

ORIGINAL RESEARCH PAPER

Genomic analysis of G4P[6] porcine group A rotavirus

Abstract

During a neonatal diarrhea outbreak that occurred in a vaccinated Brazilian pig herd in 2007, four G4P[6] rotavirus strains distinct to the porcine rotavirus prototype Gottfried strain were detected. One G4-IX P[6]-If strain (RVA/Pig-wt/BRA/BRA843/2007/G4P[6]) was chosen for characterization of all genotypes. The phylogenetic analysis of all eleven gene segments revealed the following genotype constellation: G4-P[6]-I5-R1-C1-M1-A8-C1-T7-E1-H1. This configuration is different of the porcine G4P[6] prototype (Gottfried strain) in the VP6 (I1) and NSP3 (T1) genes and is identical of a porcine-like human RVA strain recently described in a Hungarian children (RVA/Human-wt/HUN/BP1547/2005/G4P[6]). The genes analyzed revealed that the G4P[6] strain was closely related to porcine strains, porcine-like human strains, and porcine-like animal strains. NSP3 gene belonged to the T7 genotype, a rare genotype that has been detected in the bovine UK strain (prototype), in human reassortant strains, and recently in porcine strains. Our findings reinforce the porcine-origin of the T7 genotype, P[6]-If strains, and of several porcine-like human/animal RVA strains. This is the first genomic analysis of Brazilian G4P[6] porcine RVA strain and the first G4P[6] strain isolated of pig hosts bearing a T7 genotype. This study showed the presence of the T7 genotype in a Brazilian pig herd, providing important information about G4P[6] RVA strains, a genotype combination commonly identified in both humans and pigs, and about the role of pigs in the RVA evolution.

Keywords: piglets, diarrhea, enteric viruses, RVA, T7 genotype

1. Introduction

Group A rotaviruses (RVAs) are a common cause of severe gastroenteritis in children and young animals worldwide (Estes and Kapikian, 2007; Martella et al., 2010). Rotavirus is a member of the *Reoviridae* family and has a triple-layered capsid enclosing an 11-segmented double-stranded RNA (dsRNA) genome. These segments encode six structural (VP1-VP4, VP6, and VP7) and six non-structural (NSP1-NSP5/6) proteins, such that each genome segment encodes a single viral protein, except the gene 11 that can encode two viral proteins (NSP5 and NSP6) (Estes and Kapikian, 2007).

The outer layer capsid proteins, VP7 (glycoprotein) and VP4 (protease-sensitive), independently elicit neutralizing antibodies inducing protective immunity, and these genes traditionally have been used in a binary system of classification of the RVA in G and P genotypes, respectively (Estes and Kapikian, 2007). Thus far, at least 27 G and 37 P genotypes have been detected in RVAs from human and several animal hosts (Matthijnsens et al., 2011; Trojnar et al., 2013).

Recently, a new classification system of RVA, in which all 11 segments are considered was proposed using the phylogenetic analyses and the nucleotide (nt) cut-off identity values (Matthijnsens et al., 2008a,b). In this system, the whole genome, based on genotype configuration of the VP7-VP4-VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5 encoding genes, is described as G_x-P_x-I_x-R_x-C_x-M_x-A_x-N_x-T_x-E_x-H_x, where x represent the genotype number. Furthermore, a standardized RV strain nomenclature system has also been developed where the individual RVA strains are named as follows: RV group/species of origin/country of identification/common name/year of identification/G- and P-type (Matthijnsens et al., 2011).

According to this classification, so far 17I (VP6), 9R (VP1), 9C (VP2), 8M (VP3), 18A (NSP1), 10N (NSP2), 12T (NSP3), 15E (NSP4), and 11H (NSP5/6) genotypes of RVAs

have been described using 85, 83, 84, 81, 79, 85, 85, 85, and 91% of nucleotide identity cut-off values for each gene segment, respectively (Matthijnssens et al., 2011; Guo et al., 2012; Papp et al., 2012; Trojnar et al., 2013; Jere et al., 2014).

Porcine RVA is an important pathogen detected in piglets due the significant economic impact on the pig industry and is considered as potential reservoirs for genetic and antigenic diversity of human RVA strains (Mukherjee et al., 2011; Ghosh et al., 2012b; Zeller et al., 2012; Degiuseppe et al., 2013; Dong et al., 2013; Papp et al., 2013a). The most frequent G and P genotypes identified in piglets are G3, G4, G5, G9, G11, P[6], P[7], P[13], and P[23] (Winiarczyk et al., 2002; Martella et al., 2010; Kim et al., 2012; Martel-Paradis, et al., 2013; Okitsu et al., 2013; Papp et al., 2013b).

The G4P[6] genotype was first identified in a RVA strain of porcine origin (Gottfried strain) isolated from the intestinal content of a suckling diarrheic piglet (Bohl et al., 1984). This combination of G and P genotypes has been detected in human strains (Gorziglia et al., 1988), porcine-like human strains (Wang et al., 2010; Maestri et al., 2012; Degiuseppe et al., 2013; Dong et al., 2013; Papp et al., 2013a), and porcine strains (Winiarczyk et al., 2002; Lorenzetti et al., 2011).

Currently, there are complete genome sequences of G4P[6] human strains (Matthijnssens et al., 2008) and porcine-derived human strains (Wang et al., 2010; Mukherjee et al., 2011; Maestri et al., 2012; Degiuseppe et al., 2013; Papp et al., 2013a) deposited in public database. However, there is just one complete genome sequence of G4P[6] porcine RVA strain (Gottfried), which was identified in one porcine host, that has been deposited and present the following genotypes G4-P[6]-I1-R1-C1-M1-A8-N1-T1-E1-H1 (Matthijnssens et al., 2010).

G4P[6] represents one of the most important combination of G and P genotypes identified in piglets (Papp et al., 2013b) and have been commonly detected in human hosts.

The aim of this study was to characterize all eleven genes of one G4-IX P[6]-If genotype strain, recently detected during a neonatal diarrhea outbreak in a Brazilian vaccinated pig herd, that is distinct to the porcine prototype G4P[6] (Gottfried strain).

2. Materials and Methods

2.1. RVA strain

In 2007, during a neonatal diarrhea outbreak that occurred in a vaccinated pig herd, four G4P[6] strains distinct to the porcine rotavirus prototype (Gottfried strain) were identified (Lorenzetti et al., 2011) (Appendix A and B). Three of these RVA strains presented a new G4 lineage (IX) and one within the lineage G4-VI. In addition, two strains were of the P[6]-Ie genotype and another two presented the P6-If genotype that has been previously detected in porcine-like human strains (Stupka et al., 2009; Degiuseppe et al., 2013). One G4-IX P[6]-If strain (RVA/Pig-wt/BRA/BRA843/2007/G4P[6]) was selected for further analyses of all eleven genes.

2.2. Nucleic acid extraction and RT-PCR assays

Nucleic acid was extracted from 500 μ L of 10% (w/v) fecal suspension using a combination of phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1) and silica/guanidinium isothiocyanate nucleic acid extraction methods, with modifications (Alfieri et al., 2006). The nucleic acid was recovered and stored at -20°C . Structural and non-structural genes were amplified by RT-PCR using the primers described by Lee et al. (2000), Mohan and Atreya (2001), Varghese et al. (2006), Matthijnsens et al. (2008a) to amplify the VP1 (686 bp), VP2 (686 bp), VP3 (702 bp), VP6 (1,356 bp), NSP1 (1,578 bp), NSP2 (1,057 bp), NSP3 (1,077 bp), NSP4 (725 bp), and NSP5 (596 bp) genes. The RT-PCR products were identified by

1.5% agarose gel electrophoresis, stained with ethidium bromide (0.5 µg/mL) and observed under UV light.

2.3. DNA sequencing and phylogenetic analysis

RT-PCR products from each genome fragment were purified using a GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) according to the manufacturer's instructions. Nucleotide sequences of the genes were obtained by direct sequencing using the ABI3500 Genetic Analyzer sequencer and a BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), with the forward and reverse primers used in the RT-PCR assay. All genes were sequenced at least twice to confirm the accuracy of the results. Nucleotide sequences of each genome segment were submitted to RotaC2.0 automated genotyping tool for rotavirus A to determine the genotypes (Maes et al., 2009). Nucleotide BLAST searches to compare the sequences with those of other rotavirus strains available in the GenBank database were done by the National Center for Biotechnology Information (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Phylogenetic trees with 1,000 replicates were performed by the neighbor-joining method and the Kimura two-parameter model in MEGA software version 5.05 (Tamura et al., 2011) and the nucleotide identity matrices were constructed using BioEdit software version 7.1.3.0.

2.4. GenBank accession numbers

The nucleotide sequences of the gene segments obtained in the current study have been deposited in the GenBank database under the following accession numbers: VP6 (X), VP1 (X), VP2 (X), VP3 (X), NSP1 (X), NSP2 (X), NSP3 (X), NSP4 (X), and NSP5 (X).

3. Results

3.1. Genotype constellation of BRA843 G4P[6] porcine RVA strain

The coding regions of the VP7-VP4-VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5 genes of Brazilian porcine RVA strain (BRA843) described in this study were classified as G4-P[6]-I5-R1-C1-M1-A8-N1-T7-E1-H1. The genotypic constellation detected in the BRA843 strain is identical to the porcine-like human strain (RVA/Human-wt/HUN/BP1547/2005/G4P[6]) originated from an independent event of zoonotic transmission from a porcine RVA strain to a human (Table 1).

Comparing the BRA843 strain with other six RVA strains showed the same genotype configuration for 10 out of 11 segments, three porcine-like human strains (RVA/Human-wt/HUN/BP271/2000/G4P[6], RVA/Human-wt/ARG/Arg4605/2006/G4P[6], and RVA/Human-wt/BRA/HSP180/1999/G4P[6]) showed a different genotype by the VP6 gene; one porcine-like human strain (RVA/Human-wt/BEL/BE2001/2009/G9P[6]) by the VP7 gene and another within the NSP1 gene (RVA/Human-tc/CHN/R479/2004/G4P[6]). One porcine strain (RVA/Pig-wt/CAN/F8-4/2006/G2P[6]/P[7]) was different by the VP7 gene (Table 1).

Moreover, other porcine strains (Gottfried and RVA/Pig-wt/THA/CMP45/08/2008/G9P[23]) and porcine-like human strains (RVA/Human-wt/HUN/BP1490/1994/G4P[6], RVA/Human-wt/IND/mani-362/2007/G4P[6], RVA/Human-xx/CHN/LL36755/2003/G5P[6], and RVA/Human-wt/JPN/Ryukyu-1120/2011/G5P[6]) presented nine identical genotypes, while the G4P[6] human strain (ST3) exhibited three different genotypes (VP6, NSP1, and NSP3 genes) (Table 1).

3.2. Phylogenetic and sequence analyses of the structural genes (VP1, VP2, VP3, and VP6)

The partial VP1 gene segment of the BRA843 G4P[6] RVA strain shared high nt identities (84.6 to 96.6%) with strains that belong to the R1 genotype. The Brazilian G4P[6] porcine strain showed highest nt identities (93 to 96.6%) to porcine derived human strains (RVA/Human-wt/ARG/Arg4671/2006/G4P[6], RVA/Human-tc/THA/Mc345/1989/G9P[19], RVA/Human-tc/THA/Mc323/1989/G9P[19], and RVA/Human-wt/HUN/BP1792/2004/G4P[6]), and to porcine strains (RVA/Pig-wt/THA/CMP45/08/2008/G9P[23] and RVA/Pig-wt/THA/CMP29/08/2008/G3P[13]). In the phylogenetic tree, the strain identified in this study clustered with the RVA strains referred above (Table 2), suggesting that the VP1 gene was not closely related to the typical known porcine strains (OSU, YM, and Gottfried), in which it was seen nt identities varying from 86.2 to 86.5% (Figure 1A). This gene demonstrated 88% nt identity with human G4P[6] prototype ST3 strain.

The partial VP2 sequence of the BRA843 strain exhibited 85.9 to 94% nt identity with the strains (porcine strains, human strains, and animal/human strains which are fully or largely of porcine origin) that belongs to the C1 genotype. In the phylogenetic tree, this strain clustered with a Japanese porcine-like human strain (RVA/Human-wt/JPN/Ryukyuu-1120/2011/G5P[6] - 92.3% nt identity) detected in a 4-year-old diarrheic child with encephalopathy (Figure 1B). The BRA843 strain exhibited highest (94%) nt identity with two porcine strains (OSU and RVA/Pig-tc/KOR/K71/2006/G5P9[7]), and with one porcine derived bovine strain (RVA/Cow-tc/KOR/K5/2006/G5P9[7]) (Table 2). The BRA843 strain showed 92.3% nt identity with human strains (M37, DC1476, and DC1208), and 85.9% and 89.7% with the human and porcine G4P[6] prototypes, respectively.

Sequence analysis of the partial segment VP3 classified the BRA843 strain as M1 genotype with 86.7 to 94.4% nt identity with porcine strains, human strains, and

human/animal strains with porcine origin. The Brazilian G4P[6] strain showed highest nt identity (94 to 94.4%) with two porcine strains (OSU and K71) and one porcine origin cow strain (K5) (Table 2). The BRA843 strain exhibited 90.3 and 90.7% nt identity with the human and porcine G4P[6] prototypes, respectively, and moreover formed a different branch in the phylogenetic tree (Figure 1C).

The near full length nt sequence of the VP6 gene of the Brazilian porcine G4P[6] strain showed high identities (86.9 to 94%) with reference strains (porcine and porcine-like human/animal strains) of the I5 genotype. This strain clustered together with the porcine strains (CMP54, CMP67, PRG9235, PRG921, and PRG942) and porcine-like human strains (BP1547 and Ryukyu-1120) with 92.3 to 94% nt identity, but in a different branch (Figure 1D and Table 2). The G4P[6] strain described in this study exhibited 82.6 and 82.7% nt identity with the porcine (Gottfried strain) and human (ST3 strain) G4P[6] prototypes that belong to the I1 genotype.

3.3. Phylogenetic and sequence analyses of the non-structural genes (NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, and NSP5)

The NSP1 sequence of the BRA843 strain was found to belong to the A8 genotype (82 to 94% nt identity), which included porcine, porcine-human reassortant strains, and a porcine-like equine strain H1. Phylogenetic analysis revealed that the Brazilian G4P[6] porcine strain grouped with two Argentinean porcine-like human strains (RVA/Human-wt/ARG/Arg4605/2006/G4P[6] and RVA/Human-wt/ARG/Arg4671/2006/G4P[6]) with 94% and 90.9% nt identity, respectively (Figure 1E and Table 2). The BRA843 G4P[6] strain showed 91.2% nt identity with the G4P[6] prototype porcine strain Gottfried that located in other cluster.

The NSP2 nt sequence of the BRA843 strain showed high (86.6 to 96.4%) identity with genotype N1 strains belonging to a wide range of host species. The Brazilian porcine G4P[6] was clustered with a porcine origin equine strain H1 (96.4%), porcine human reassortant strain IAL28 (95.3%), porcine strain SWRV5 (94.5%), and porcine-like human strain Ryukyu-1120 (94%), but was distant to the OSU, YM, and Gottfried (87.1 to 88.1 nt identity) porcine strains and G4P[6] human strain ST3 (87.3% nt identity) (Figure 1F and Table 2).

Analysis of NSP3 sequence demonstrated that the BRA843 strain clustered with the T7 genotype (87 to 95% nt identity), being most closely related to the T7 prototype bovine UK strain (RVA/Cow-tc/GBR/UK/1973/G6P7[5]) at 95% (Figure 1G and Table 2). The porcine strains (Gottfried, OSU, and YM) belong to a different genotype (T1) together with the human G4P[6] prototype (ST3 strain), whose nt identity with BRA843 ranged from 82.2 to 83.6%.

The NSP4 gene segment of the BRA843 strain shared high nt identities (86.2 to 96.5%) with representative strains of the E1 genotype. The G4P[6] porcine strain of this study revealed highest nt identity (94.8 to 96.5%) and grouped with two porcine human reassortant strains from Brazil (RVA/Human-wt/BRA/HSE005/1998/G4P[6] and RVA/Human-wt/BRA/COD424/1991/G4P[6]), and with one porcine strain from Venezuela (RVA/Pig-tc/VEN/A34/1985/G5P[23]) (Figure 1H and Table 2).

Sequence analysis of NSP5 gene revealed that the G4P[6] strain from Brazil clustered into the H1 genotype (92.8 to 99% nt identity) and was closely related with one porcine-like human strain (RVA/Human-wt/ARG/Arg4671/2006/G4P[6]), one Brazilian porcine human reassortant strain (RVA/Human-wt/BRA/HSP180/1999/G4P[6]), and one Brazilian porcine strain (RVA/Pig-wt/BRA/SWRV1/2012/GXP[X]) whose nt identity ranged from 98.1 to

99%. The BRA843 strain is located in a different branch of Gottfried strain (Figure 1I and Table 2).

4. Discussion

G4 and P[6] are genotypes commonly detected in human and porcine RVA strains worldwide (Martella et al., 2010; Gómez et al., 2013; Heylen et al., 2013; Papp et al., 2013a,b; Ianiro et al., 2014). In humans, the G4 genotype is more frequently detected in association with P[8] genotype (Ianiro et al., 2014). On the other hand, this genotype is more frequently detected with P[6] genotype in pigs (Winiarczyk et al., 2002; Lorenzetti et al., 2011; Papp et al., 2013b). The porcine G4 and P[6] genotypes have been recognized as the third and the second most prevalent G and P genotypes in pigs, respectively (Papp et al., 2013b).

G4 and/or P[6] human RVA strains which are fully or largely of porcine origin have been continuously identified in children worldwide (Mukherjee et al., 2009; Wang et al., 2010; Mukherjee et al., 2011; Maestri et al., 2012; Mladenova et al., 2012; Zeller et al., 2012; Degiuseppe et al., 2013; Dong et al., 2013; Komoto et al., 2013; Papp et al., 2013a; Do et al., 2014). However, there are few studies with the G4P[6] genotype combination (Wang et al., 2010; Mukherjee et al., 2011; Maestri et al., 2012; Degiuseppe et al., 2013; Dong et al., 2013; Papp et al., 2013a).

This study determined all the genes of one G4P[6] porcine RVA strain (BRA843) identified in a piglet with neonatal diarrhea in a vaccinated pig herd from Brazil that was different to the G4P[6] porcine prototype (Gottfried strain). The Brazilian G4P[6] strain identified in this study presented the genotype constellation G4-P[6]-I5-R1-C1-M1-A8-N1-T7-E1-H1. There is only one G4P[6] full-length genome sequence isolated of pig host (Gottfried strain) available in public database (Matthijnssens et al., 2010), on the other hand,

there are several porcine-like human G4P[6] strains (Wang et al., 2010; Mukherjee et al., 2011; Maestri et al., 2012; Degiuseppe et al., 2013; Dong et al., 2013; Papp et al., 2013a). Recently, the genome analyses of one porcine-like rotavirus strain detected in a Hungarian child (RVA/Human-wt/HUN/BP1547/2005/G4P[6]) demonstrated the same genotype constellation described in BRA843 porcine strain (Papp et al., 2013a). When compared with the Gottfried strain (G4P[6] porcine prototype), the porcine RVA strain described in this study exhibited different genotypes by the VP6 (I) and NSP3 (T) genes (Matthijnssens et al., 2010).

The VP7 gene showed higher nt (88.3%) identity and was more related with the G4 sublineage Ib (human strains), but could not be classified into any of the G4 lineages, forming a new G4 lineage (IX) and the VP4 gene was closely related and exhibited high nt identity with the P[6] sublineage If (Lorenzetti et al., 2011), that had already been detected in two Argentinean children with acute diarrhea (Stupka et al., 2009). The full genomic analysis of human Argentinean G4P[6] strains confirmed the porcine origin in 10 out of 11 genes analyzed and suggested two independent interspecies transmission events (Degiuseppe et al., 2013).

The phylogenetic analyses and nt identity of VP1, VP2, VP3, VP6, NSP1, NSP2, NSP4, and NSP5 genes revealed that the Brazilian G4-IX P[6]-If porcine RVA strain was closely related to porcine, porcine-like human, and porcine-like animal strains. Our findings reinforce the porcine origin of the P[6]-If previously detected in humans (Degiuseppe et al., 2013) and that the evolution of P[6] genotype between humans and piglets is highly intermingled (Martella et al., 2006). The P[6] genotype distinct to the porcine Gottfried strain as described in this study is more frequently detected in Brazilian pig herds than the P[6] Gottfried genotype (Lorenzetti et al., unpublished data).

Based on the new classification system, it has been proposed that Wa-like human strains and porcine strains can be of a common origin (Matthijnssens et al., 2008a). The genome backbone identified in the BRA843 strain is similar to those of the prototype porcine strains (OSU, Gottfried, and YM) and was also shared by Wa-like human RVA strains. Most of the genes analyzed herein showed that BRA843 is closely related to porcine strains and to animal/human strains of complete or partial porcine origin, reinforcing the porcine origin of these strains.

NSP3 gene of the BRA843 strain revealed 95% nt identity with reference strain of the T7 genotype (bovine UK strain). T7 is a rare genotype that has also been detected in porcine-human reassortment (Wang et al., 2010), bovine-human reassortment (Mukherjee et al., 2011), porcine-like human (Maestri et al., 2012; Zeller et al., 2012; Degiuseppe et al., 2013; Papp et al., 2013a), and recently, in porcine RVA strains (Martel-Paradis et al., 2013; Okitsu et al., 2013). Martel-Paradis et al. (2013) analyzed three Canadian porcine strains with this genotype and proposed that the T7 genotype can be a porcine NSP3 allele. However, Papp et al. (2013a) suggested that the bovine UK strain could be a bovine-porcine reassortant strain. Okitsu et al. (2013) also detected the T7 genotype in one G9P[23] Thailand porcine strain. Our study also supports the porcine origin of this genotype. Papp et al. (2013a) speculated that some genes that belong to common human RVA genotypes and that were detected in the Hungarian porcine-like human G4P[6] strains also could have a porcine origin, for example the I1 genotype (VP6 gene), that is a genotype commonly detected in human strains and also have been identified only in the porcine Gottfried strain.

Pigs are regarded as important reservoir for the genetic and antigenic diversity found in human and animal rotaviruses (Martella et al., 2010). In addition to the pig, RVA strains of porcine origin have been detected in human (Ghosh et al., 2012b; Zeller et al., 2012; Dong et al., 2013), cow (Park et al., 2011), horse (Ghosh et al., 2012a), and panda (Guo et al., 2013)

hosts. Full genomic analysis of animal and human strains are important to determine the actual origin of one strain, gene reassortment and interspecies transmission events, and the rotavirus evolutionary relationships (Matthijnssens et al., 2008a,b). There are complete genome porcine-like human/animal strains that showed genes with porcine origin (Maestri et al., 2012; Ghosh et al., 2012a,b; Zeller et al., 2012; Komoto et al., 2013; Papp et al., 2013a; Park et al., 2011, 2013). Alternatively, Kim et al. (2012) suggested more attention with the VP4, VP6, VP7, and NSP1 genes to study the possible porcine origin of novel RVA strains, since most of porcine and porcine-like human/animal RVA strains revealed typical porcine genotypes in these genes.

The number of whole genome sequences of human RVA strains is increasing, but although pigs are important for the understanding of RVA evolution, there are still few complete genome sequences of porcine strains available (Matthijnssens et al., 2008a, 2010; Kim et al., 2012; Martel-Paradis et al., 2012; Okitsu et al., 2013). More complete genome data of porcine strains are necessary to understand the rotavirus evolution and the dynamic interaction with human and other animal strains.

5. Conclusion

There are no studies of the complete genome sequences of porcine RVA strains from Brazil. The genomic analysis of one Brazilian G4-IX P[6]-If porcine strain different to the G4P[6] porcine prototype (Gottfried strain) supports the porcine origin of the P[6]-If lineage. These findings enhance the information relative to the role of pigs as reservoirs of G4P[6] genotype for the diversity of human RVA strains and increase the number of porcine sequences available in public database. In addition, the results from this study describe the first G4P[6] porcine strain detected in a pig host bearing a T7 genotype, and presence of this

genotype in Brazilian pig herds, and reinforce that the genome analysis is important to understand the diversity and evolution mechanisms of the rotavirus strains.

References

Alfieri, A.A., Parazzi, M.E., Takiuchi, E., Médici, K.C., Alfieri, A.F., 2006. Frequency of group A rotavirus in diarrhoeic calves in Brazilian cattle herds, 1998-2002. *Trop. Anim. Health Prod.* 38, 521–526.

Bányai, K., Esona, M.D., Kerin, T.K., Hull, J.J., Mijatovic, S., Váscónez, N., Torres, C., Filippis, A.M.B., Gentsch, J.R., 2009. Molecular characterization of a rare, human-porcine reassortant rotavirus strain, G11P[6], from Ecuador. *Arch. Virol.* 154, 1823–1829.

Bohl, E.H., Theil, K.W., Saif, L.J., 1984. Isolation and serotyping of porcine rotaviruses and antigenic comparison with other rotaviruses. *J. Clin. Microbiol.* 19, 105–111.

Degiuseppe, J.I., Beltramino, J.C., Millán, A., Stupka, J.A., Parra, G.I., 2013. Complete genome analyses of G4P[6] rotavirus detected in Argentinean children with diarrhoea provides evidence of interspecies transmission from swine. *Clin. Microbiol. Infect.* 19, E367–E371.

Do, L.P., Nakagomi, T., Nakagomi, O., 2014. A rare G1P[6] super-short human rotavirus strain carrying an H2 genotype on the genetic background of a porcine rotavirus. *Infect. Genet. Evol.* 21, 334–350.

Dong, H.J., Qian, Y., Huang, T., Zhu, R.N., Zhao, L.Q., Zhang, Y., Li, R.C., Li, Y.P., 2013. Identification of circulating porcine–human reassortant G4P[6] rotavirus from children with acute diarrhea in China by whole genome analyses. *Infect. Genet. Evol.* 20, 155–162.

Estes, M.K., Kapikian, A.Z., 2007. Rotaviruses. In: Knipe, D.M., Howley, P.M., Griffin, D.E., Lamb, R.A., Martin, M.A., Roizman, B., Straus, S.E. (Eds.), *Fields Virology*, 5th ed., vol. 2. Lippincott, Williams & Wilkins/Wolters Kluwer, Philadelphia, PA, pp. 1917–1974.

Ghosh, S., Kobayashi, N., Nagashima, S., Chawla-Sarkar, M., Krishnan, T., Ganesh, B., Naik, T.N., 2010. Full genomic analysis and possible origin of a porcine G12 rotavirus strain RU172. *Virus Genes* 40, 382–388.

Ghosh, S., Shintani, T., Kobayashi, N., 2012a. Evidence for the porcine origin of equine rotavirus strain H-1. *Vet. Microbiol.* 158, 410–414.

Ghosh, S., Urushibara, N., Taniguchi, K., Kobayashi, N., 2012b. Whole genomic analysis reveals the porcine origin of human G9P[19] rotavirus strains Mc323 and Mc345. *Infect. Genet. Evol.* 12, 471–477.

Gómez, M.M., Silva, M.F.M., Zeller, M., Heylen, E., Matthijnssens, J., Ichihara, M.Y.T., Rose, T.L., Volotão, E.M., Leite, J.P.G., 2013. Phylogenetic analysis of G1P[6] group A rotavirus strains detected in Northeast Brazilian children fully vaccinated with Rotarix™. *Infect. Genet. Evol.* 19, 395–402.

Gorziglia, M., Green, K., Nishikawa, K., Taniguchi, K., Jones, R., Kapikian, A.Z., Chanock, R.M., 1988. Sequence of the fourth gene of human rotaviruses recovered from asymptomatic or symptomatic infections. *J. Virol.* 62, 2978–2984.

Guo, D., Liu, J., Lu, Y., Sun, Y., Yuan, D., Jiang, Q., Lin, H., Li, C., Si, C., Qu, L., 2012. Full genomic analysis of rabbit rotavirus G3P[14] strain N5 in China: Identification of a novel VP6 genotype. *Infect. Genet. Evol.* 12, 1567–1576.

Guo, L., Yan, Q., Yang, S., Wang, C., Chen, S., Yang, X., Hou, R., Quan, Z., Hao, Z., 2013. Full genome sequence of giant panda rotavirus strain CH-1. *Genome Announc.* 1, e00241–12.

Heylen, E., Zeller, M., Ciarlet, M., De Coster, S., Van Ranst, M., Matthijnssens, J., 2013. Complete genetic characterization of human G2P[6] and G3P[6] rotavirus strains. *Infect. Genet. Evol.* 13, 27–35.

Ianiro, G., Delogu, R., Bonomo, P., Fiore, L., Ruggeri, F.M., “RotaNet-Italy Study Group”, 2014. Molecular analysis of group A rotaviruses detected in adults and adolescents with severe acute gastroenteritis in Italy in 2012. *J. Med. Virol.* doi: 10.1002/jmv.23871.

Jere, K.C., Esona, M.D., Ali, Y.H., Peenze, I., Roy, S., Bowen, M.D., Saeed, I.K., Khalafalla, A.I., Nyaga, M.M., Mphahlele, J., Steele, D., Seheri, M.L., 2014. Novel NSP1 genotype characterised in an African camel G8P[11] rotavirus strain. *Infect. Genet. Evol.* 21, 58–66.

Kim, H.H., Matthijnssens, J., Kim, H.J., Kwon, H.J., Park, J.G., Son, K.Y., Ryu, E.H., Kim, D.S., Lee, W.S., Kang, M.I., Yang, D.K., Hyun, B.H., Park, S.I., Park, S.J., Cho, K.O., 2012. Full-length genomic analysis of porcine G9P[23] and G9P[7] rotavirus strains isolated from pigs with diarrhea in South Korea. *Infect. Genet. Evol.* 12, 1427–1435.

Komoto, S., Maeno, Y., Tomita, M., Matsuoka, T., Ohfu, M., Yodoshi, T., Akeda, H., Taniguchi, K., 2013. Whole genomic analysis of a porcine-like human G5P[6] rotavirus strain isolated from a child with diarrhoea and encephalopathy in Japan. *J. Gen. Virol.* 94, 1568–1575.

Lee, C.N., Wang, Y.L., Kao, C.L., Zao, C.L., Lee, C.Y., Chen, H.N., 2000. NSP4 gene analysis of rotaviruses recovered from infected children with and without diarrhea. *J. Clin. Microbiol.* 38, 4471–4477.

Lorenzetti, E., Medeiros, T.N.S., Alfieri, A.F., Alfieri, A.A., 2011. Genetic heterogeneity of wild-type G4P[6] porcine rotavirus strains detected in a diarrhea outbreak in a regularly vaccinated pig herd. *Vet. Microbiol.* 154, 191–196.

Maes, P., Matthijssens, J., Rahman, M., Van Ranst, M., 2009. RotaC: A web-based tool for the complete genome classification of group A rotaviruses. *BMC Microbiol.* 9, 238.

Maestri, R.P., Kaiano, J.H.L., Neri, D.L., Soares, L.S., Guerra, S.F.S., Oliveira, D.S., Farias, Y.N., Gabbay, Y.B., Leite, J.P.G., Linhares, A.C., Mascarenhas, J.D.P., 2012. Phylogenetic analysis of probable non-human genes of group A rotaviruses isolated from children with acute gastroenteritis in Belém, Brazil. *J. Med. Virol.* 84, 1993–2002.

Martel-Paradis, O., Laurin, M.A., Martella, V., Sohal, J.S., L'Homme, Y., 2013. Full-length genome analysis of G2, G9 and G11 porcine group A Rotaviruses. *Vet. Microbiol.* 162, 94–102.

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

Martella, V., Bányai, K., Matthijnsens, J., Buonavoglia, C., Ciarlet, M., 2010. Zoonotic aspects of rotaviruses. *Vet. Microbiol.* 140, 246–255.

Matthijnsens, J., Ciarlet, M., Heiman, E., Arijs, I., Delbeke, T., McDonald, S.M., Palombo, E.A., Iturriza-Gómara, M., Maes, P., Patton, J.T., Rahman, M., Van Ranst, M., 2008a. Full genome-based classification of rotaviruses reveals a common origin between human Wa-like and porcine rotavirus strains and human DS-1-like and bovine rotavirus strains. *J. Virol.* 82, 3204–3219.

Matthijnsens, J., Ciarlet, M., Rahman, M., Attoui, H., Bányai, K., Estes, M.K., Gentsch, J.R., Iturriza-Gómara, M., Kirkwood, C.D., Martella, V., Mertens, P.P.C., Nakagomi, O., Patton, J.T., Ruggeri, F.M., Saif, L.J., Santos, N., Steyer, A., Taniguchi, K., Desselberger, U., Van Ranst, M., 2008b. Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. *Arch. Virol.* 153, 1621–1629.

Matthijnsens, J., Rahman, M., Ciarlet, M., Zeller, M., Heylen, E., Nakagomi, T., Uchida, R., Hassan, Z., Azim, T., Nakagomi, O., Van Ranst, M., 2010. Reassortment of human rotavirus gene segments into G11 rotavirus strains. *Emerg. Infect. Dis.* 16, 625–630.

Matthijnsens, J., Ciarlet, M., McDonald, S.M., Attoui, H., Bányai, K., Brister, J.R., Buesa, J., Esona, M.D., Estes, M.K., Gentsch, J.R., Iturriza-Gómara, M., Johne, R., Kirkwood, C.D., Martella, V., Mertens, P.P., Nakagomi, O., Parreño, V., Rahman, M., Ruggeri, F.M., Saif, L.J., Santos, N., Steyer, A., Taniguchi, K., Patton, J.T., Desselberger, U., Van Ranst, M., 2011. Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the rotavirus classification working group (RCWG). *Arch. Virol.* 156, 1397–1413.

Mladenova, Z., Papp, H., Lengyel, G., Kisfali, P., Steyer, A., Steyer, A.F., Esona, M.D., Iturriza-Gómara, M., Bányai, K., 2012. Detection of rare reassortant G5P[6] rotavirus, Bulgaria. *Infect. Genet. Evol.* 12, 1676–1684.

Mohan, K.V.K.; Atreya, C.D., 2001. Nucleotide sequence analysis of rotavirus gene 11 from two tissue culture-adapted ATCC strains, RRV and Wa. *Virus Genes* 23, 321–329.

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

Mukherjee, A., Ghosh, S., Bagchi, P., Dutta, D., Chattopadhyay, S., Kobayashi, N., Chawla-Sarkar, M., 2011. Full genomic analyses of human rotavirus G4P[4], G4P[6], G9P[19] and G10P[6] strains from north-eastern India: Evidence for interspecies transmission and complex reassortment events. *Clin. Microbiol. Infect.* 17, 1343–1346.

Okitsu, S., Khamrin, P., Thongprachum, A., Kongkaew, A., Maneekarn, N., Mizuguchi, M., Hayakawa, S., Ushijima, H., 2013. Whole-genomic analysis of G3P[23], G9P[23] and G3P[13] rotavirus strains isolated from piglets with diarrhea in Thailand, 2006–2008. *Infect. Genet. Evol.* 18, 74–86.

Papp, H., Al-Mutairi, L.Z., Chehadeh, W., Farkas, S.L., Lengyel, G., Jakab, F., Martella, V., Szűcs, G., Bányai, K., 2012. Novel NSP4 Genotype in a camel G10P[15] rotavirus strain. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 59, 411–421.

Papp, H., Borzák, R., Farkas, S., Kisfali, P., Lengyel, G., Molnár, P., Melegh, B., Matthijnssens, J., Jakab, F., Martella, V., Bányai, K., 2013a. Zoonotic transmission of reassortant porcine G4P[6] rotaviruses in Hungarian pediatric patients identified sporadically over a 15 year period. *Infect. Genet. Evol.* 19, 71–80.

Papp, H., László, B., Jakab, F., Ganesh, B., De Grazia, S., Matthijnssens, J., Ciarlet, M., Martella, V., Bányai, K., 2013b. Review of group A rotavirus strains reported in swine and cattle. *Vet. Microbiol.* 165, 190–199.

Park, S.I., Matthijnssens, J., Saif, L.J., Kim, H.J., Park, J.G., Alfajaro, M.M., Kim, D.S., Son, K.Y., Yang, D.K., Hyun, B.H., Kang, M.I., Cho, K.O., 2011. Reassortment among bovine, porcine and human rotavirus strains results in G8P[7] and G6P[7] strains isolated from cattle in South Korea. *Vet. Microbiol.* 152, 55–66.

Park, J.G., Kim, H.J., Matthijnssens, J., Alfajaro, M.M., Kim, D.S., Son, K.Y., Kwon, H.J., Hosmillo, M., Ryu, E.H., Kim, J.Y., Cena, R.B., Lee, J.H., Kang, M.I., Park, S.I., Cho, K.O.,

2013. Different virulence of porcine and porcine-like bovine rotavirus strains with genetically nearly identical genomes in piglets and calves. *Vet. Res.* 44, 88.

Stupka, J.A., Carvalho, P., Amarilla, A.A., Massana, M., Parra, G.I., 2009. National rotavirus surveillance in Argentina: High incidence of G9P[8] strains and detection of G4P[6] strains with porcine characteristics. *Infect. Genet. Evol.* 9, 1225–1231.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28, 2731–2739.

Trojnar, E., Sachsenröder, J., Twardziok, S., Reetz, J., Otto, P.H., Johne, R., 2013. Identification of an avian group A rotavirus containing a novel VP4 gene with a close relationship to those of mammalian rotaviruses. *J. Gen. Virol.* 94, 136–142.

Varghese, V., Das, S., Singh, N.B., Kojima, K., Bhattacharya, S.K., Krishnan, T., Kobayashi, N., Naik, T.N., 2004. Molecular characterization of a human rotavirus reveals porcine characteristics in most of the genes including VP6 and NSP4. *Arch. Virol.* 149, 155–172.

Varghese, V., Ghosh, S., Das, S., Bhattacharya, S.K., Krishnan, T., Karmakar, P., Kobayashi, N., Naik, T.N., 2006. Characterization of VP1, VP2 and VP3 gene segments of a human rotavirus closely related to porcine strains. *Virus Genes* 32, 241–247.

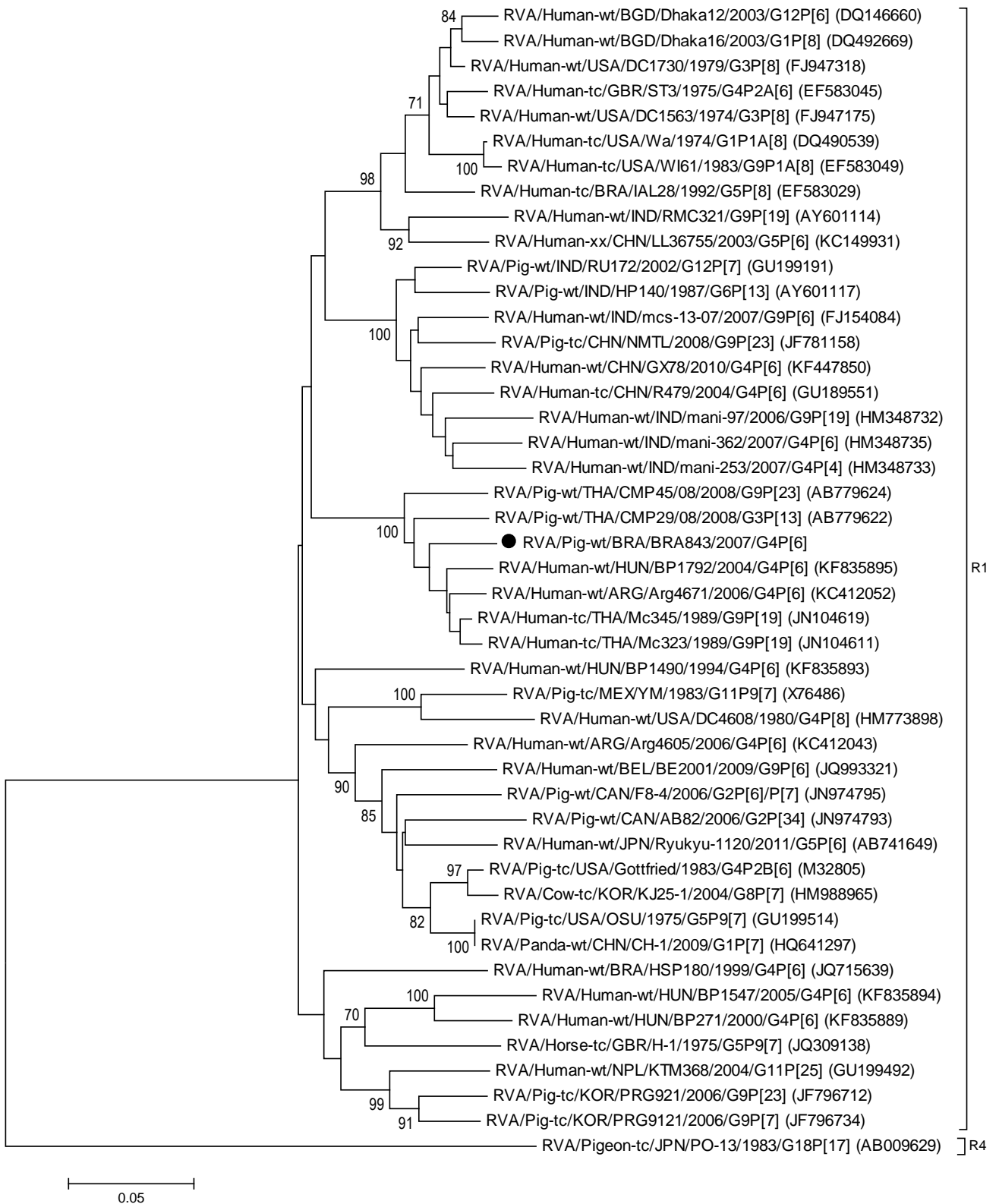
Wang, Y.H., Kobayashi, N., Nagashima, S., Zhou, X., Ghosh, S., Peng, J.S., Hu, Q., Zhou, D.J., Yang, Z.Q., 2010. Full genomic analysis of a porcine–bovine reassortant G4P[6] rotavirus strain R479 isolated from an infant in China. *J. Med. Virol.* 82, 1094–1102.

Winiarczyk, S., Paul, P.S., Mummidi, S., Panek, R., Gradzki, Z., 2002. Survey of porcine rotavirus G and P genotype in Poland and the United States using RT-PCR. *J. Vet. Med. B* 49, 373–378.

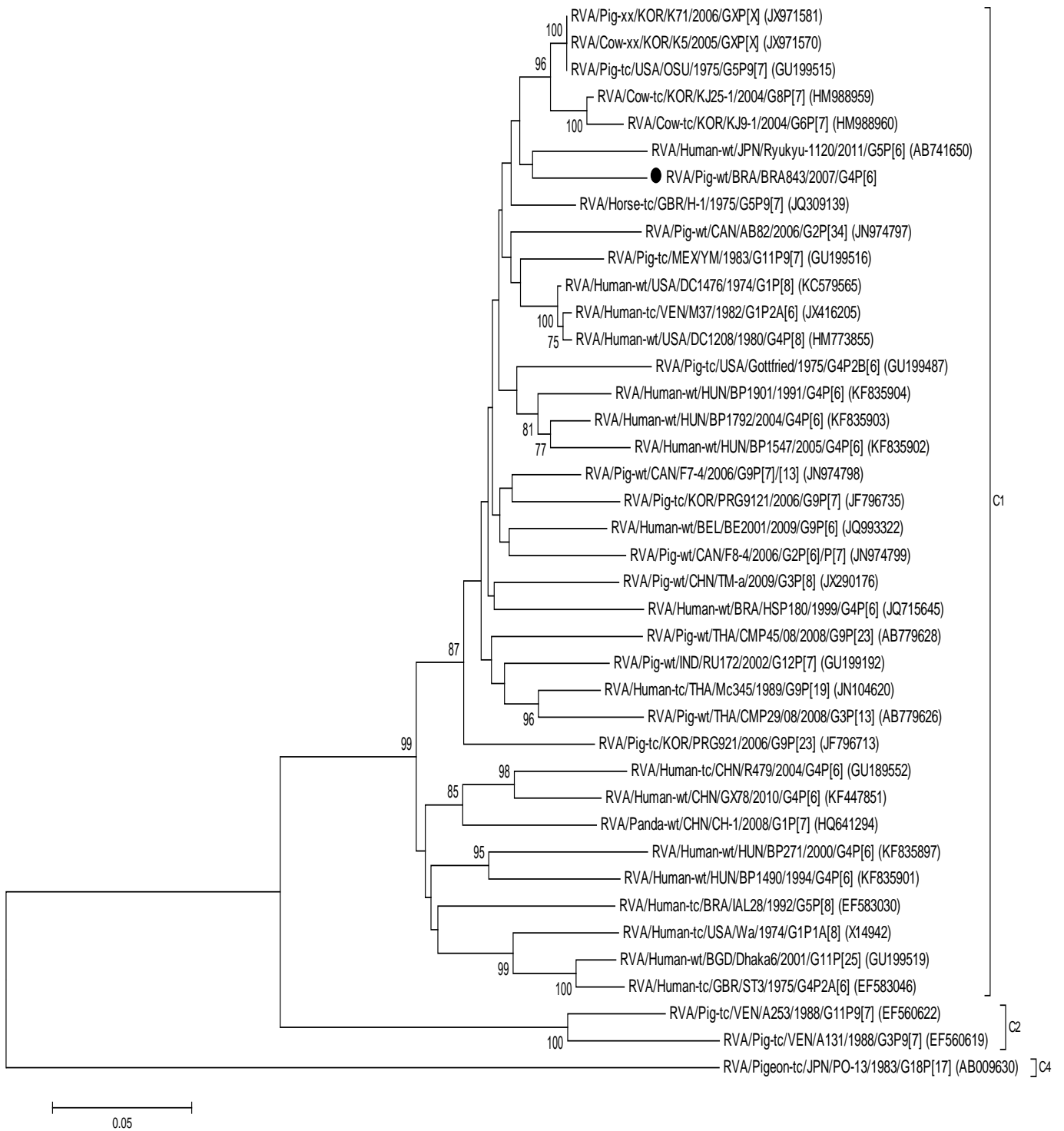
Zeller, M., Heylen, E., Coster, S., Van Ranst, M., Matthijssens, J., 2012. Full genome characterization of a porcine-like human G9P[6] rotavirus strain isolated from an infant in Belgium. *Infect. Genet. Evol.* 12, 1492–1500.

Figure 1. Phylogenetic analyses based on the nucleotide sequences of structural proteins (A) VP1, (B) VP2, (C) VP3, and (D) VP6 and nonstructural proteins (E) NSP1, (F) NSP2, (G) NSP3, (H) NSP4, and (I) NSP5 of encoding genes of the BRA843 porcine RVA strain with representative human and animal RVA strains. The trees were constructed using the neighbor-joining method, Kimura two-parameter model with 1,000 bootstrap replicates (values >70% are shown). The scale bars at the bottom of the trees represents nucleotide substitutions per site. The Brazilian porcine RVA strain described in this study is indicated by filled circle. An outgroup sequence (RVA/Pigeon-tc/JPN/PO-13/1983/G18P[17]) of each gene was included. GenBank accession numbers of reference strains are indicated between parentheses.

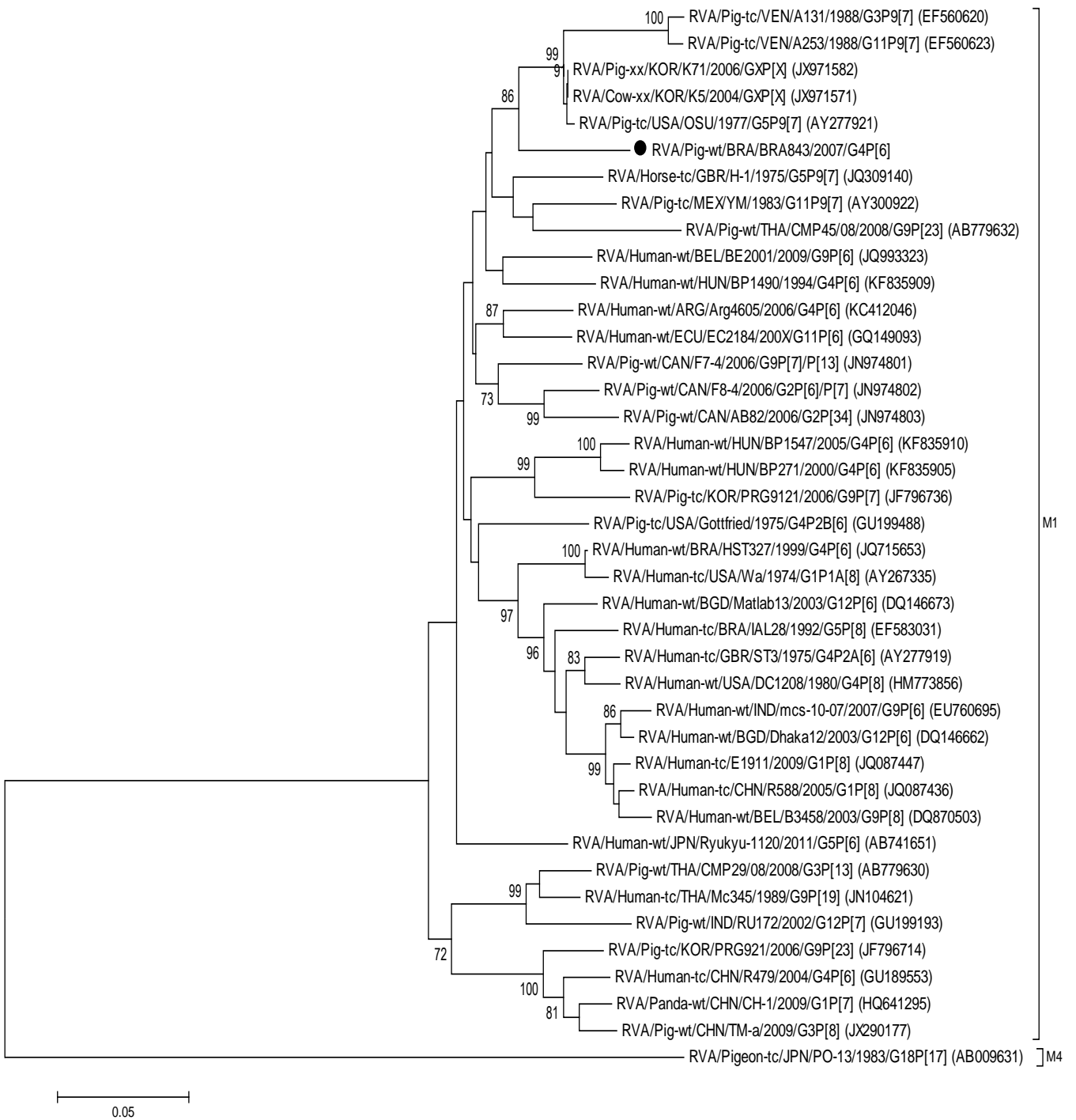
A) VP1



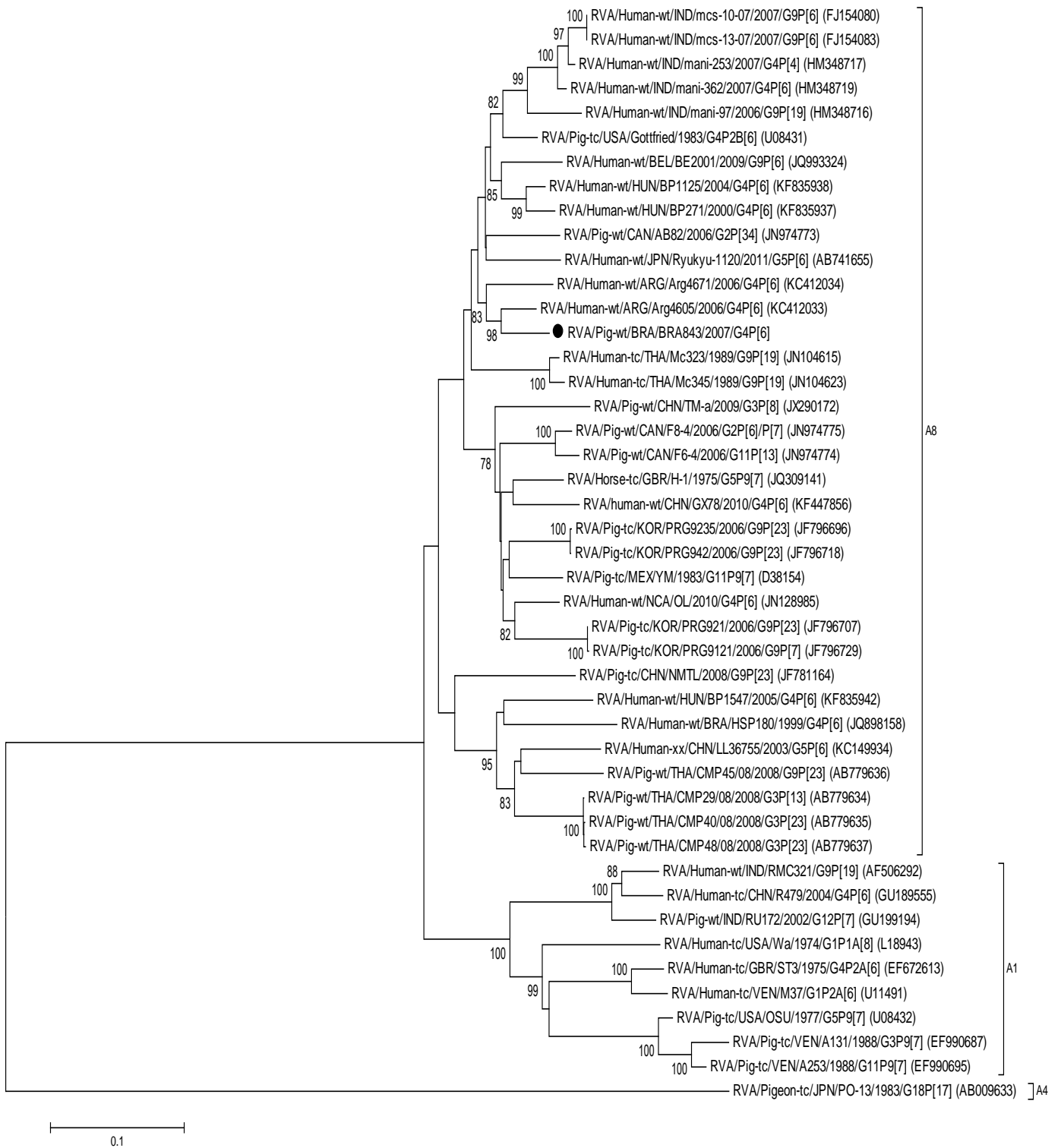
B) VP2



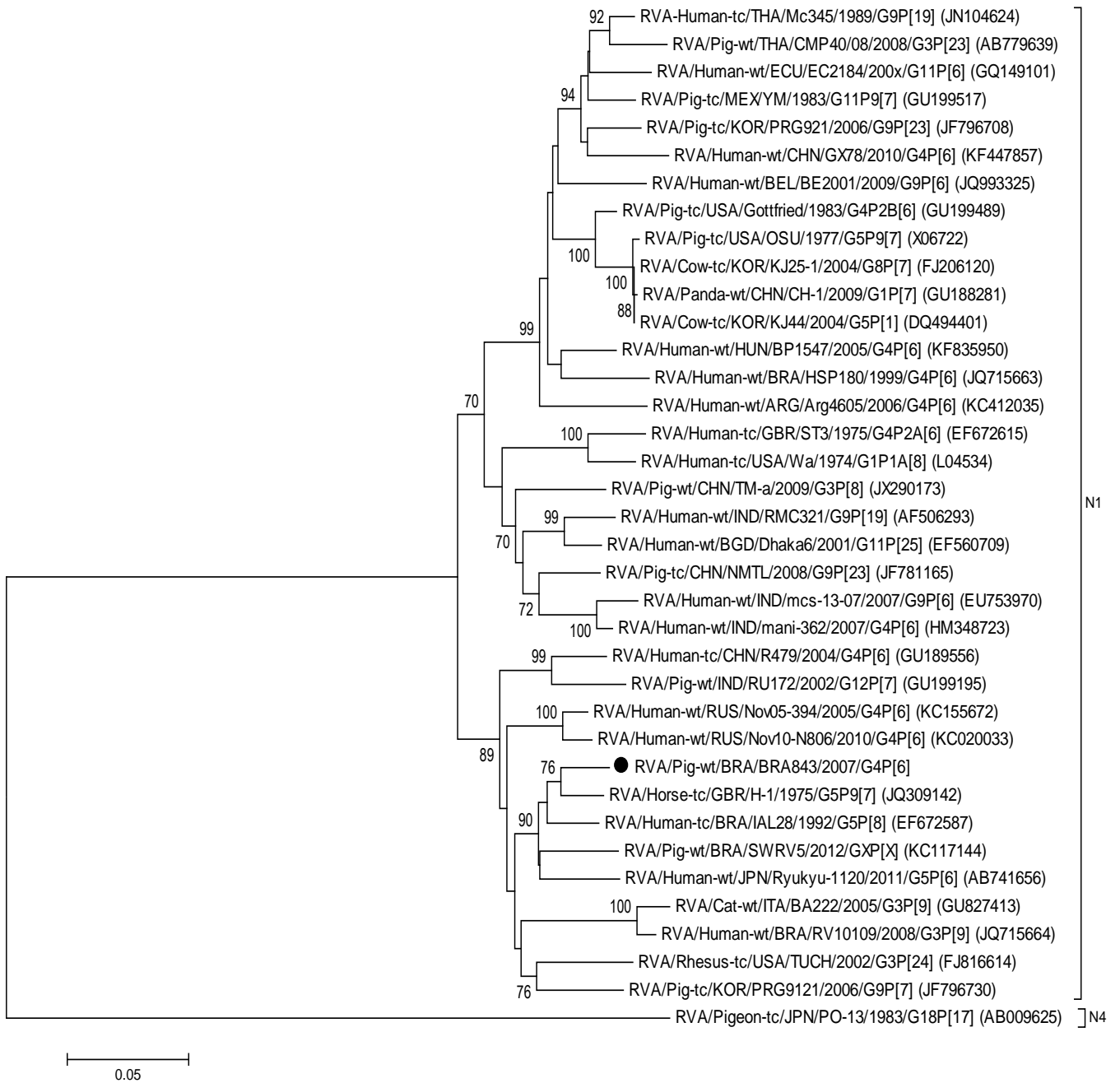
C) VP3



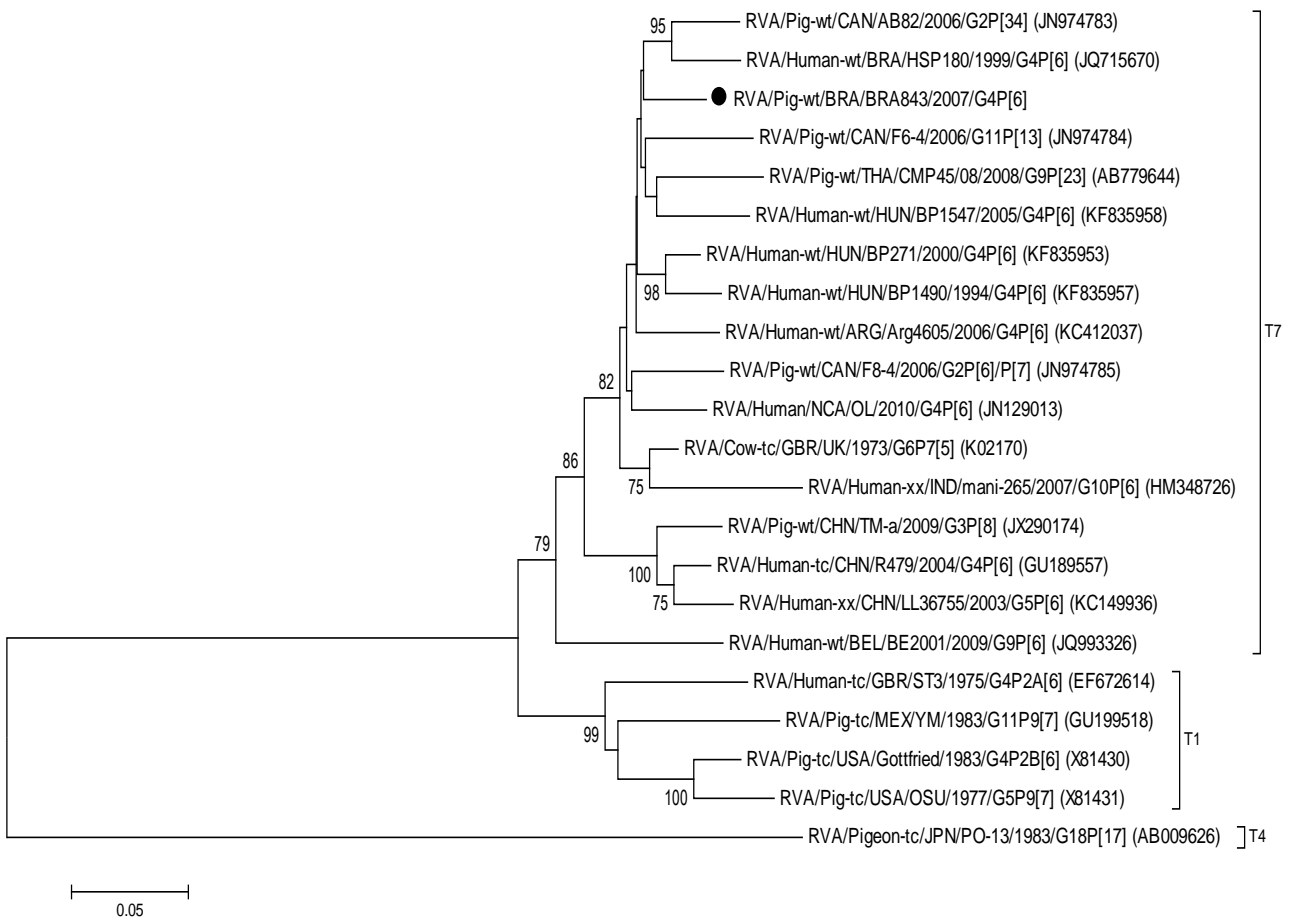
E) NSP1



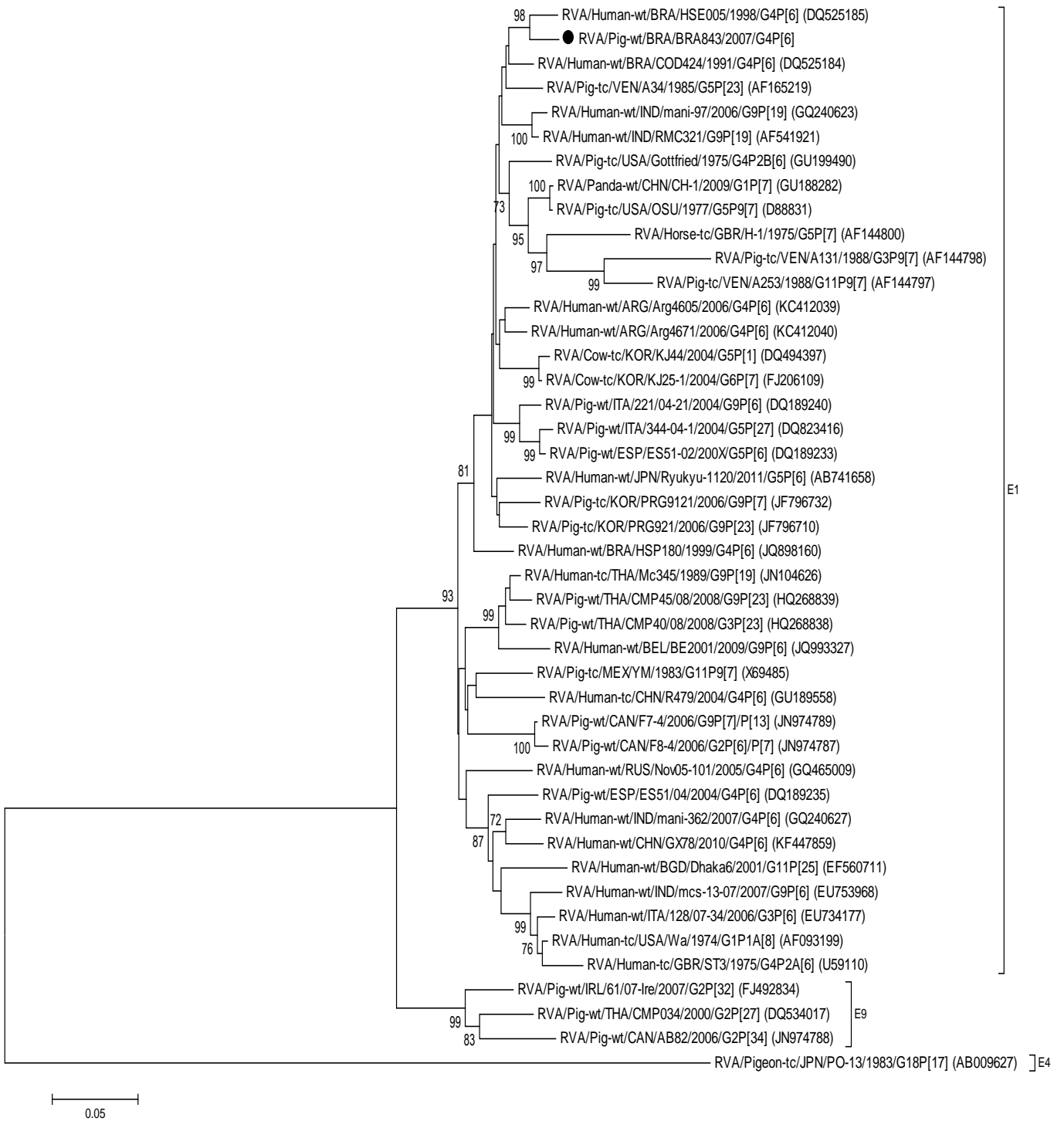
F) NSP2



G) NSP3



H) NSP4



D) NSP5

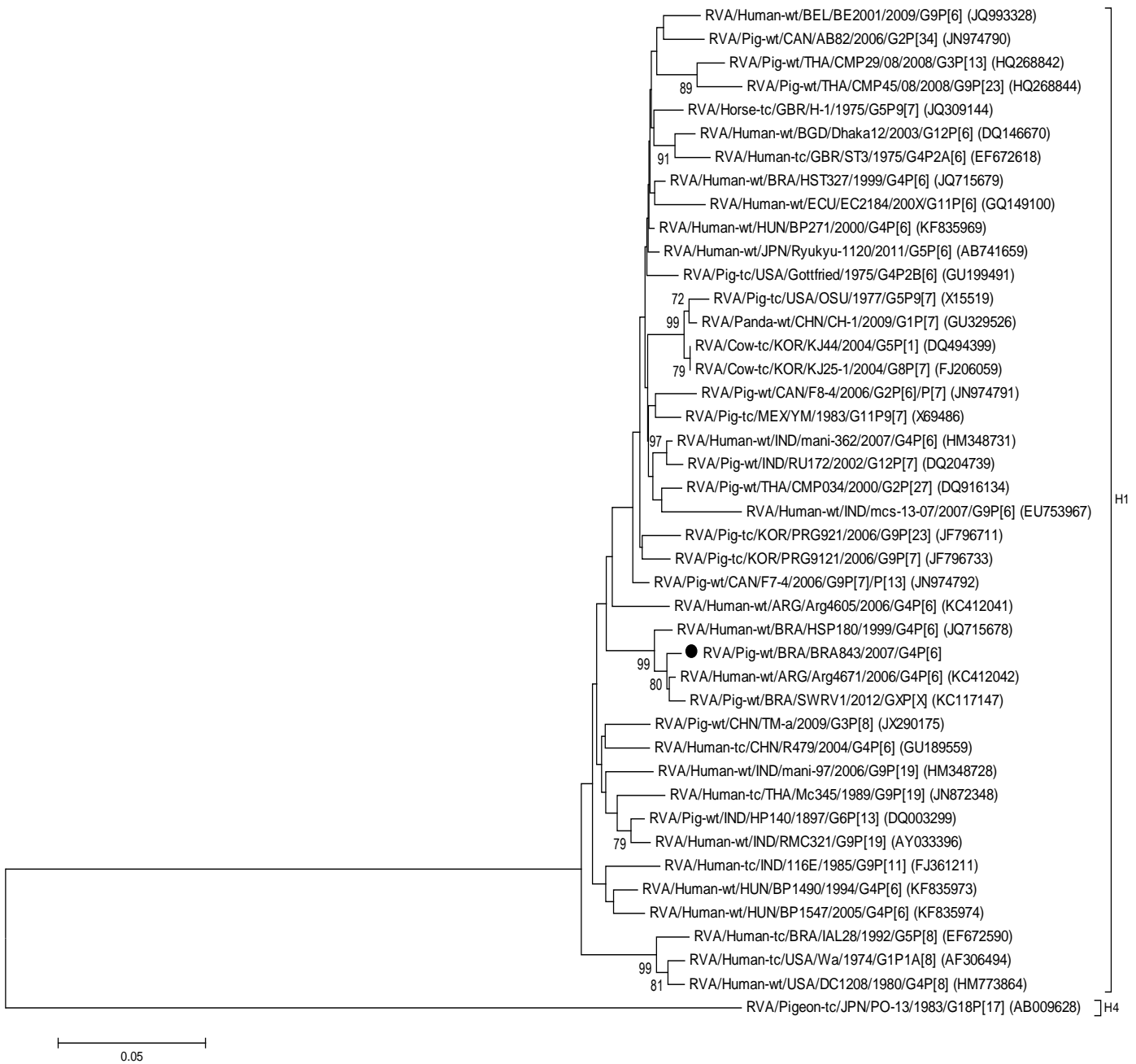


Table 1. Genotype constellation and genetic relatedness of the 11 gene segments of G4P[6] porcine RVA strain described in the present study (letters in bold) with other relevant RVA strains from several species. Genotypes are colored with green (porcine/human genotypes), red (bovine/human genotypes), blue (typical porcine genotypes), purple (typical bovine genotype), and yellow (G4 and P[6] genotypes).

Strain	VP7	VP4	VP6	VP1	VP2	VP3	NSP1	NSP2	NSP3	NSP4	NSP5	Reference
RVA/Human-tc/USA/Wa/1974	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1	Matthijnsens et al. (2008a)
RVA/Pig-wt/BRA/BRA843/2007/G4P[6]	G4	P[6]	I5	R1	C1	M1	A8	N1	T7	E1	H1	This study
RVA/Pig-tc/USA/Gottfried/1983/G4P2BP[6]	G4	P[6]	I1	R1	C1	M1	A8	N1	T1	E1	H1	Matthijnsens et al. (2010)
RVA/Human-tc/GBR/ST3/1975/G4P2A[6]	G4	P[6]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1	Matthijnsens et al. (2008a)
RVA/Human-tc/CHN/R479/2004/G4P[6]	G4	P[6]	I5	R1	C1	M1	A1	N1	T7	E1	H1	Wang et al. (2010)
RVA/Human-wt/HUN/BP1547/2005/G4P[6]	G4	P[6]	I5	R1	C1	M1	A8	N1	T7	E1	H1	Papp et al. (2013a)
RVA/Human-wt/HUN/BP271/2000/G4P[6]	G4	P[6]	I1	R1	C1	M1	A8	N1	T7	E1	H1	Papp et al. (2013a)
RVA/Human-wt/ARG/Arg4605/2006/G4P[6]	G4	P[6]	I1	R1	C1	M1	A8	N1	T7	E1	H1	Degiuseppe et al. (2013)
RVA/Human-wt/BRA/HSP180/1999/G4P[6]	G4	P[6]	<i>I1</i>	<i>R1</i>	<i>C1</i>	<i>M1</i>	A8	N1	T7	E1	H1	Maestri et al. (2012)
RVA/Human-wt/HUN/BP1490/1994/G4P[6]	G4	P[6]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T7	E1	H1	Papp et al. (2013a)
RVA/Human-wt/IND/mani-362/2007/G4P[6]	G4	P[6]	I1	<i>R1</i>	<i>C1</i>	<i>M1</i>	A8	N1	T1	E1	H1	Mukherjee et al. (2011)
RVA/Human-wt/IND/mani-253/2007/G4P[4]	G4	P[4]	I1	<i>R1</i>	<i>C1</i>	M2	A8	N1	T1	E1	H1	Mukherjee et al. (2011)
RVA/Pig-wt/CAN/F8-4/2006/G2P[6]/P[7]	G2	P[6]*	I5	R1	C1	M1	A8	N1	T7	E1	H1	Martel-Paradis et al. (2013)
RVA/Human-wt/BEL/BE2001/2009/G9P[6]	G9	P[6]	I5	R1	C1	M1	A8	N1	T7	E1	H1	Zeller et al. (2012)
RVA/Human-wt/IND/mcs-13-07/2007/G9P[6]	G9	<i>P[6]</i>	I1	<i>R1</i>	<i>C1</i>	<i>M1</i>	A8	N1	T1	E1	H1	Mukherjee et al. (2009)
RVA/Human-wt/ECU/EC2184/200X/G11P[6]	G11	<i>P[6]</i>	I1	<i>R1</i>	<i>C1</i>	<i>M1</i>	<i>A1</i>	N1	T1	E1	H1	Bányai et al. (2009)
RVA/Human-xx/CHN/LL36755/2003/G5P[6]	G5	P[6]	I1	R1	C1	M1	A8	N1	T7	E1	H1	unpublished.
RVA/Human-wt/BGR/BG620/2008/G5P[6]	G5	P[6]	I1	R1	C1	M1	A8	N1	T1	E1	H1	Madlenova et al. (2012)
RVA/Human-tc/JPN/AU19/1997/G1P[6]	G1	P[6]	I5	R1	C1	M1	A8	N1	T1	E1	H2	Do et al. (2014)
RVA/Human-wt/JPN/Ryukyu-1120/2011/G5P[6]	G5	P[6]	I5	R1	C1	M1	A8	N1	T1	E1	H1	Komoto et al. (2013)
RVA/Pig-wt/CAN/AB82/2006/G2P[34]	G2	P[34]	I5*	R1	C1	M1	A8	N1	T7	E9	H1	Martel-Paradis et al. (2013)
RVA/Pig-wt/IND/RU172/2002/G12P[7]	G12	<i>P[7]</i>	I5	R1	<i>C1</i>	M1	A1	N1	T1	E1	H1	Ghosh et al. (2010)
RVA/Pig-tc/USA/OSU/1977/G5P9[7]	G5	P[7]	I5	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1	Matthijnsens et al. (2010)
RVA/Pig-tc/MEX/YM/1983/G11P9[7]	G11	P[7]	I5	R1	C1	M1	A8	N1	T1	E1	H1	Matthijnsens et al. (2010)
RVA/Pig-tc/KOR/PRG921/2006/G9P[23]	G9	P[23]	I5	R1	C1	M1	A8	N1	T1	E1	H1	Kim et al. (2012)
RVA/Pig-tc/KOR/PRG9121/2006/G9P[7]	G9	P[7]	I5	R1	C1	M1	A8	N1	T1	E1	H1	Kim et al. (2012)
RVA/Horse-tc/GBR/H-1/1975/G5P[7]	G5	P[7]	I5	R1	C1	M1	A8	N1	T1	E1	H1	Ghosh et al. (2012a)
RVA/Human-wt/IND/RMC321/G9P[19]	G9	P[19]	I5	<i>R1</i>	<i>C1</i>	<i>M1</i>	A1	N1	T1	E1	H1	Varghese et al. (2004)
RVA/Panda-wt/CHN/CH-1/2009/G1P[7]	G1	P[7]	I5	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1	Guo et al. (2013)
RVA/Pig-wt/THA/CMP29/08/2008/G3P[13]	G3	P[13]	I5	R1	C1	M1	A8	N1	T1	E1	H1	Okitsu et al. (2013)
RVA/Pig-wt/THA/CMP40/08/2008/G3P[23]	G3	P[23]	I5	R1	C1	M1	A8	N1	T1	E1	H1	Okitsu et al. (2013)
RVA/Pig-wt/THA/CMP45/08/2008/G9P[23]	G9	P[23]	I5	R1	C1	M1	A8	N1	T7	E1	H1	Okitsu et al. (2013)
RVA/Human-tc/THA/Mc345/1989/G9P[19]	G9	P[19]	I5	R1	C1	M1	A8	N1	T1	E1	H1	Ghosh et al. (2012b)
RVA/Pig-tc/VEN/A131/1988/G3P9[7]	G3	P[7]	I5	R1	C2	M1	A1	N1	T1	E1	H1	Matthijnsens et al. (2008a)
RVA/Pig-tc/VEN/A253/1988/G11P9[7]	G11	P[7]	I5	R1	C2	M1	A1	N1	T1	E1	H1	Matthijnsens et al. (2008a)
RVA/Human-xx/IND/mani-265/2007/G10P[6]	G10	P[6]	I2	R2	C2	M2	A3	N2	T7	E2	H2	Mukherjee et al. (2011)
RVA/Cow-tc/GBR/UK/1973/G6P7[5]	G6	P[5]	I2	R2	C2	M2	A3	N2	T7	E2	H3	Matthijnsens et al. (2008a)
RVA/Cow-tc/KOR/KJ25-1/2004/G8P[7]	G8	P[7]	I5	R1	C1	M2	<i>A1</i>	N1	<i>T1</i>	<i>E1</i>	H1	Park et al. (2011)

*Two Canadian porcine RVA strains have mixed genotypes. The F8-4 strain (P[6]/P[7]) and AB82 strain (I5/I14). Gene segments that are only partially sequenced are indicated in italic.

Table 2. Origin and highest percentage identity of Brazilian RVA/Pig-wt/BRA/BRA843/2007/G4P[6] group A rotavirus strain based on nucleotide levels.

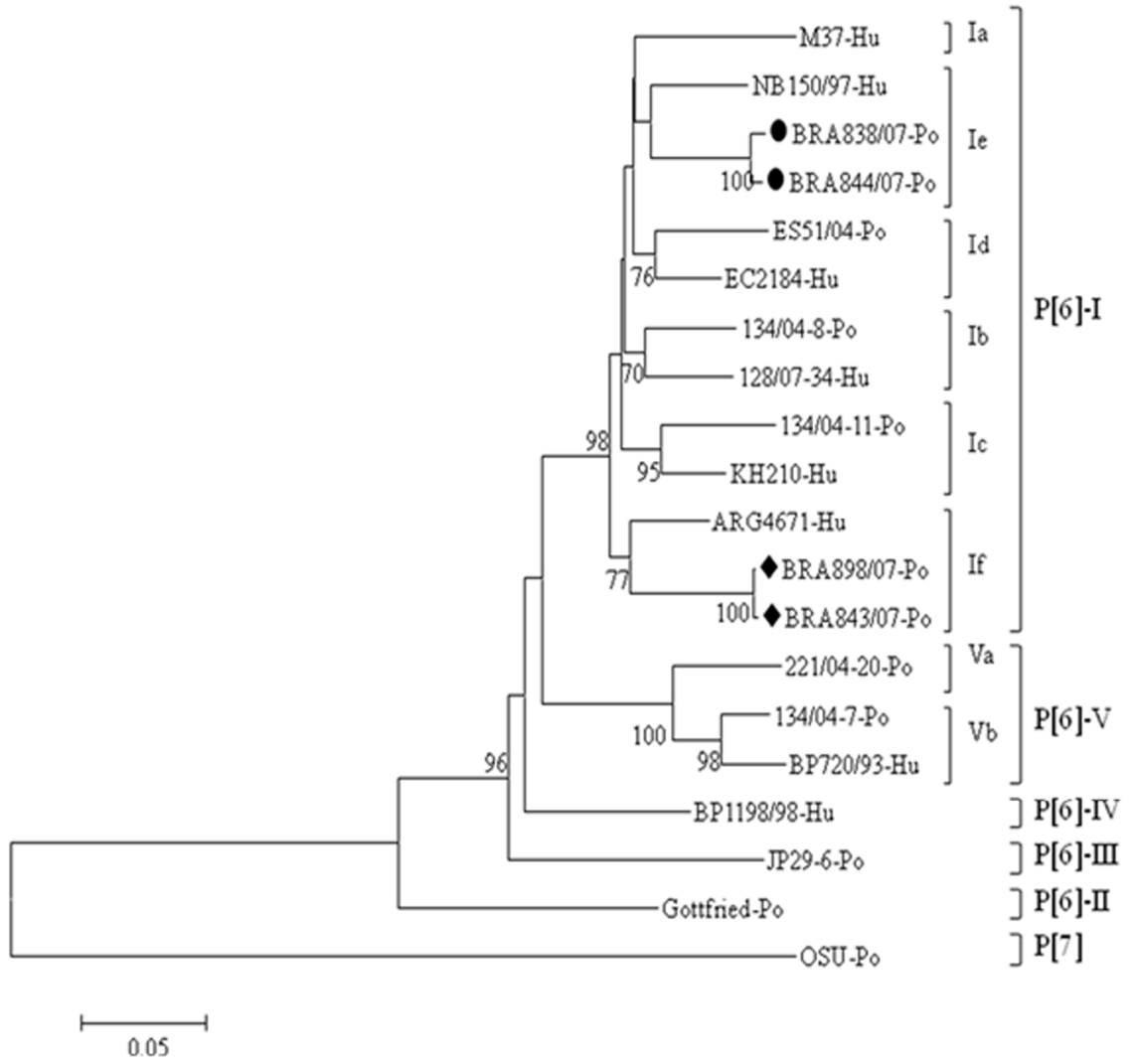
Gene	RVA/Pig-wt/BRA/BRA843/G4P[6]	
VP1	R1 - porcine origin	
	BRA/Human-wt/ARG/Arg4671/2006/G4P[6]	96.6%
VP2	C1 - porcine origin	
	RVA/Pig-tc/USA/OSU/1975/G5P9[7]	94%
	RVA/Pig-tc/KOR/K71/2006/G5P9[7]	94%
	RVA/Cow-tc/KOR/K5/2005/G5P9[7]	94%
VP3	M1 - porcine origin	
	RVA/Pig-tc/KOR/K71/2006/G5P9[7]	94.4%
	RVA/Cow-tc/KOR/K5/2005/G5P9[7]	94.4%
	RVA/Pig-tc/USA/OSU/1975/G5P9[7]	94%
VP6	I5 - porcine origin	
	RVA/Human-wt/HUN/BP1547/2005/G4P[6]	94%
	RVA/Pig-tc/KOR/PRG9235/2006/G9P[23]	93.5%
	RVA/Pig-tc/KOR/PRG921/2006/G9P[23]	93.5%
NSP1	A8 - porcine origin	
	RVA/Human-wt/ARG/Arg4605/2006/G4P[6]	94.1%
NSP2	N1 - porcine origin	
	RVA/Horse-tc/GBR/H-1/1975/G5P9[7]	96.4%
NSP3	T7 - bovine/porcine origin	
	RVA/Cow-tc/GBR/UK/1973/G6P7[5]	95%
	RVA/Human-wt/HUN/BP271/2000/G4P[6]	94.6%
NSP4	E1 - porcine origin	
	RVA/Human-wt/BRA/HSE005/1998/G4P[6]	96.5%
NSP5	H1 - porcine origin	
	RVA/Human-wt/ARG/Arg4671/2006/G4P[6]	99%
	RVA/Pig-wt/BRA/SWRV1/2012/GXP[X]	98.7%

4. CONCLUSÕES

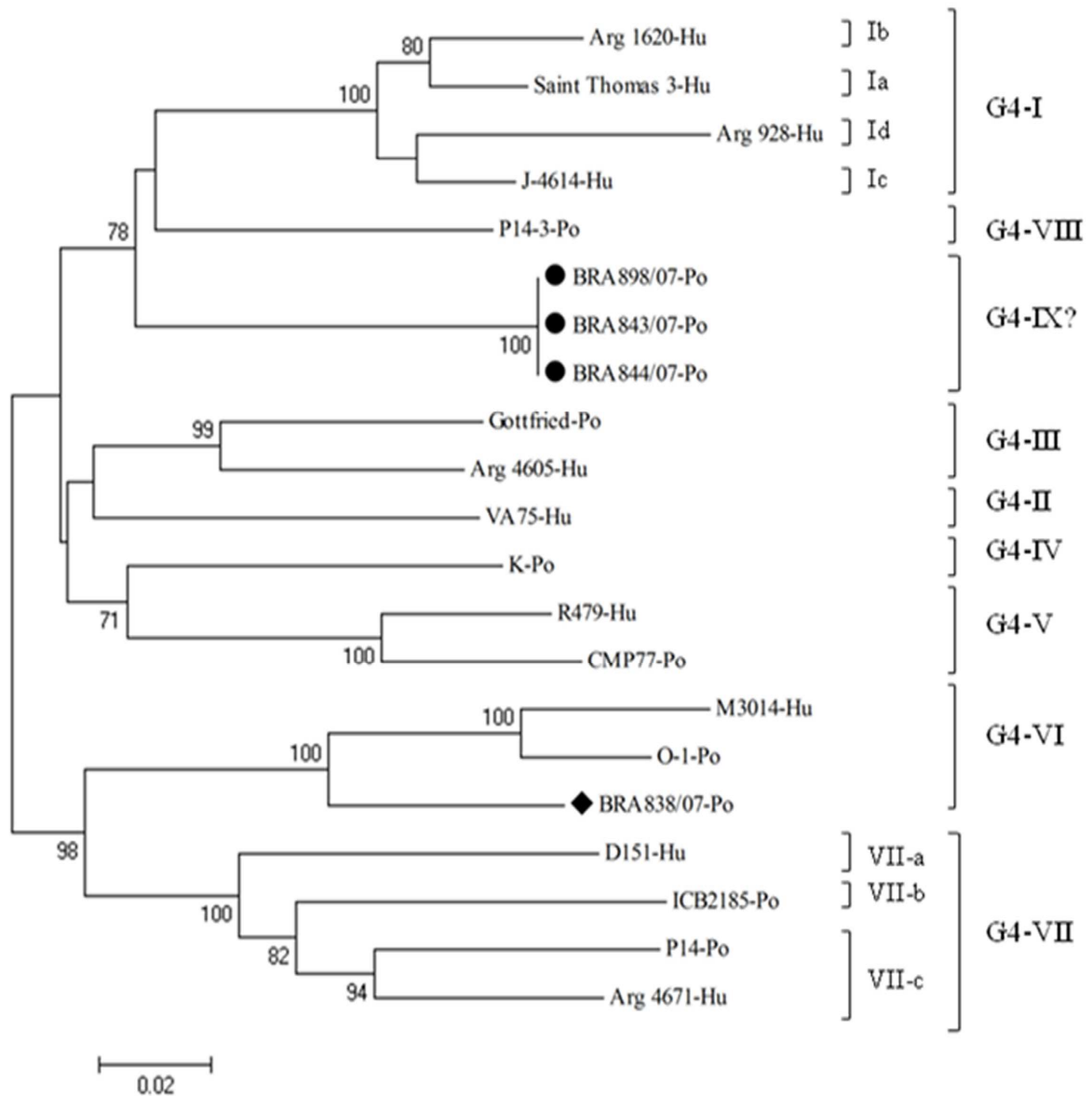
4. CONCLUSÕES

- Com base nas sequências de nucleotídeos de duas cepas (BRA381 e BRA382) de RVA suíno foi possível a descrição do genotipo G26 no continente Americano;
- A cepa BRA381 de RVA suíno é constituída por uma combinação incomum de genotipos G e P (G26P[13]) descrita pela primeira vez em cepas de RVA;
- A análise dos 11 genes da cepa brasileira BRA843 de RVA suíno genotipo G4-IX P[6]-If revelou uma constelação de genotipos com a estrutura *Wa-like* e a presença de genotipos típicos de cepas de RVA detectadas em suínos (G4-P[6]-I5-R1-C1-M1-A8-C1-T7-E1-H1);
- Em um hospedeiro suíno a descrição do genotipo T7 (gene NSP3), presente na cepa BRA843 é inédita em uma cepa de RVA G4P[6] portadora de uma constelação de genotipos característicos de cepas de RVA suíno;
- Esse é o primeiro estudo realizado no Brasil que descreve e analisa todos os genes presentes em uma cepa de RVA animal.

APÊNDICE A: Árvore filogenética do gene VP4 (VP8*) - Cepa BRA843



APÊNDICE B: Árvore filogenética do gene VP7 - Cepa BRA843



ANEXO A: Lista de reagentes

1. 100 mM dNTP Set, 4 x 250 µL; 25 µmol cada (100 mM dATP Solution, 100 mM dCTP Solution, 100 mM dGTP Solution, 100 mM dTTP Solution) (*Invitrogen™ Life Technologies, EUA*)
2. 10 x PCR-Buffer (200 mM Tris-HCl, pH 8,4, 500 mM KCl) (*Invitrogen™ Life Technologies, EUA*)
3. 123 bp DNA Ladder (*Invitrogen™ Life Technologies, EUA*)
4. 2-Mercaptoetanol (C₂H₆O₅) P.M. 78,13 (Fluka[®])
5. Acetona P.A. (CH₃COCH₃) P.M. 58,08 (Dinâmica[®])
6. Ácido acético glacial P.A. (CH₃COOH) P.M. 60,05 (Nuclear[®])
7. Ácido bórico (H₃BO₃) P.M. 61,83 (Sicalab[®])
8. Ácido clorídrico (HCl) P.M. 36,46 (Reagen[®])
9. Ácido etilenodiaminotetraácido sal di-sódico - EDTA P.A. (C₁₀H₁₄N₂O₈Na₂·2H₂O) P.M. 372,24 (Reagen[®])
10. Acrilamida P.M. 71,08 (Gibco BRL[®])
11. Agar Noble (Difco[®])
12. Agarose (*Invitrogen™ Life Technologies, EUA*)
13. Água DEPEC (Dietil pirocarbonato) (*Invitrogen™ Life Technologies[®], EUA*)
14. Álcool etílico absoluto (C₂H₅OH) P.M. 46,07 (Nuclear[®])
15. Álcool isoamílico ((CH₃)₂CHCH₂CH₂OH) P.M. 88,15 (Synth[®])
16. Azul de bromofenol (Sigma[®], EUA)
17. Bicarbonato de sódio P.A. (NaHCO₃) P.M. 84,01 (Biotec[®])
18. *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit* (*Applied Biosystems[®], EUA*)
19. Bis-acrilamida P.M. 154,2 (Sigma[®], EUA)
20. Borohidreto de sódio P.M. 37,83 (Sigma[®], EUA)
21. Brometo de etídeo (C₂₁H₂₀N₃Br) P.M. 394,3 (Sigma[®], EUA)
22. Cloreto de Cálcio Puro (CaCl₂) P.M. 110,94 (*Invitrogen™ Life Technologies, EUA*)
23. Cloreto de Potássio P.A. (KCl) P.M. 74,56 (Reagen[®])
24. Cloreto de Sódio P.A. (NaCl) P.M. 58,45 (Reagen[®])
25. Clorofórmio P.A. (CHCl₃) P.M. 119,38 (Dinâmica[®])
26. Dióxido de sílica (SiO₂) P.M. 60,08 (Sigma[®], EUA)

27. Dodecil Sulfato de Sódio - Lauril Sulfato de Sódio - SDS ($C_{12}H_{25}NaO_4S$) P.M. 288,38 (BDH)
28. Fenol (C_6H_5OH) P.M. 94,11 (*InvitrogenTM Life Technologies[®]*, EUA)
29. Fosfato de sódio dibásico anidro (Na_2HPO_4) P.M. 141,96 (Synth[®])
30. Fosfato de sódio monobásico ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$) P.M. 155,99 (Reagen[®])
31. Fosfato de sódio dihidratado ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$) P.M. 177,99 (Merck[®])
32. GFX PCR DNA and *Gel Band Purification Kit* (*GE Healthcare*, UK)
33. Glicina P.A. P.M. 75,07 (Nuclear[®])
34. Glicose $C_6H_{12}O_6$ P.M. 180,16 (Reagen[®])
35. Hidróxido de Sódio P.A. (NaOH) P.M. 40,00 (*Mallinckrodt Chemicals[®]*)
36. Hidroximetil amino metano - TRIS 99% P.M. 121,14 (Merck)
37. Isotiocianato de guanidina P.M. 118,16 (*InvitrogenTM Life Technologies, EUA*)
38. Metanol, P.A. (CH_3OH) P.M. 32,04 (Allkimia[®])
39. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) Con3 (VP4) (forward; 5'-TGGCTTCGCCATTTTATAGACA -3'; nucleotídeo 11-32) GENTSCH et al. (1992) - 200 pmol (*InvitrogenTM Life Technologies[®]*, EUA)
40. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) Con2 (VP4) (reverse; 5'-ATTTCCGACCATTTATAACC -3'; nucleotídeo 868-887) GENTSCH et al. (1992) - 200 pmol (*InvitrogenTM Life Technologies[®]*, EUA)
41. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) Beg9 (VP7) (forward; 5'-GGCTTTAAAAGAGAGAATTTCCGTCTGG -3'; nucleotídeo 1-28) GOUVEA et al. (1990) - 200 pmol (*InvitrogenTM Life Technologies, EUA[®]*)
42. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) End9 (VP7) (reverse; 5'-GGTCACATCATACAATTCTAATCTAAG -3'; nucleotídeo 1062-1036) GOUVEA et al. (1990) - 200 pmol (*InvitrogenTM Life Technologies[®]*, EUA)
43. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) VP1F (RVA) (VP1) (forward; 5'-GGCTATTAAAGCTGTACAATGGG -3'; nucleotídeo 1-23) VARGHESE et al. (2006) - 200 pmol (*InvitrogenTM Life Technologies[®]*, EUA)
44. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) VP1IR (RVA) (VP1) (reverse; 5'-TAATCCTCATGAGAAAACACTGAC -3'; nucleotídeo 663-686) VARGHESE et al. (2006) - 200 pmol (*InvitrogenTM Life Technologies[®]*, EUA)
45. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) VP2F (RVA) (VP2) (forward; 5'-GGCTATTAAAGGCTCAATGGCG -3'; nucleotídeo 1-22) VARGHESE et al. (2006) - 200 pmol (*InvitrogenTM Life Technologies[®]*, EUA)

46. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) VP2IR (RVA) (VP2) (reverse; 5'-CTTCATCTTGAAATATAGCATCAC -3'; nucleotídeo 663-686) VARGHESE et al. (2006) - 200 pmol (*Invitrogen™ Life Technologies®*, EUA)
47. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) VP3F (RVA) (VP3) (forward 5'-GGCTATTAAGCAGTACCAGTAG -3'; nucleotídeo 1-23) VARGHESE et al. (2006) - 200 pmol (*Invitrogen™ Life Technologies®*, EUA)
48. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) VP3IR (RVA) (VP3) (reverse; 5'-GTAAACATAGATTCATTACGCGGACC -3'; nucleotídeo 677-702) VARGHESE et al. (2006) - 200 pmol (*Invitrogen™ Life Technologies®*, EUA)
49. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) GEN_VP6F (RVA) (VP6) (forward; 5'-GGCTTTWAAACGAAGTCTTC -3'; nucleotídeo 1-20) MATTHIJNSSENS et al. (2008a) - 200 pmol (*Invitrogen™ Life Technologies®*, EUA)
50. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) GEN_VP6R (RVA) (VP6) (reverse; 5'-GGTCACATCCTCTCACT -3'; nucleotídeo 1356-1340) MATTHIJNSSENS et al. (2008a) - 200 pmol (*Invitrogen™ Life Technologies®*, EUA)
51. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) GEN_NSP1F (RVA) (NSP1) (forward; 5'-GGCTTTTTTTTATGAAAAGTCTTG -3'; nucleotídeo 1-23) MATTHIJNSSENS et al. (2008a) - 200 pmol (*Invitrogen™ Life Technologies®*, EUA)
52. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) GEN_NSP1R (RVA) (NSP1) (reverse; 5'-GGTCACATTTTATGCTGCC -3'; nucleotídeo 1560-1578) MATTHIJNSSENS et al. (2008a) - 200 pmol (*Invitrogen™ Life Technologies®*, EUA)
53. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) GEN_NSP2F (RVA) (NSP2) (forward; 5'-GGCTTTTAAAGCGTCTCAG -3'; nucleotídeo 1-19) MATTHIJNSSENS et al. (2008a) - 200 pmol (*Invitrogen™ Life Technologies®*, EUA)
54. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) GEN_NSP2R (RVA) (NSP2) (reverse; 5'-GGTCACATAAGCGCTTTC -3'; nucleotídeo 1041-1057) MATTHIJNSSENS et al. (2008a) - 200 pmol (*Invitrogen™ Life Technologies®*, EUA)
55. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) GEN_NSP3F (RVA) (NSP3) (forward; 5'-GGCTTTTAATGCTTTTCAGTG -3'; nucleotídeo 1-21) MATTHIJNSSENS et al. (2008a) - 200 pmol (*Invitrogen™ Life Technologies®*, EUA)
56. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) GEN_NSP3R (RVA) (NSP3) (reverse; 5'-ACATAACGCCCTATAGC -3'; nucleotídeo 1056-1073) MATTHIJNSSENS et al. (2008a) - 200 pmol (*Invitrogen™ Life Technologies®*, EUA)

57. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) 10BEG.16 (RVA) (NSP4) (forward; 5'-TGTTCCGAGAGAGCGCGTG -3'; nucleotídeo 16-34) LEE et al. (2000) - 200 pmol (*Invitrogen™ Life Technologies®*, EUA)
58. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) 10END.722 (RVA) (NSP4) (reverse 5'-GACCATTCCCTTCATTAAC -3'; nucleotídeo 722-740) LEE et al. (2000) - 200 pmol (*Invitrogen™ Life Technologies®*, EUA)
59. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) NSP5/NSP6-F (RVA) (NSP5/6) (forward 5'-GGCTTTAAAAGCGCATAGTGATGT -3'; nucleotídeo 22-46) MOHAN e ATREYA (2001) - 200 pmol (*Invitrogen™ Life Technologies®*, EUA)
60. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) NSP5/NSP6-R (RVA) (NSP5/6) (reverse 5'-GGTCACAAAACGGGAGTGGGGGAG -3'; nucleotídeo 618-594) MOHAN e ATREYA (2001) - 200 pmol (*Invitrogen™ Life Technologies®*, EUA)
61. *Platinum Taq DNA Polymerase* 500 unidades (*Invitrogen™ Life Technologies*, BRA)
62. *Quant-iT™ Working Solution* (*Invitrogen™ Life Technologies*, EUA)
63. Sacarose, P.A. - sucrose (C₁₂H₂₂O₁₁) P.M. 342,31 (*Reagen®*)
64. *Superscript™ II RNase H - Reverse Transcriptase* – 200 unidades/μL (*Invitrogen™ Life Technologies*, EUA)
65. Triton x-100 (*J.T.Baker®*)

ANEXO B: Soluções e tampões

- **Hidratação da sílica**

- 6 g de sílica (O_2Si)
- Adicionar 50 mL de água bidestilada
- Agitar lentamente e manter em repouso durante 24 h
- Por sucção, desprezar 44 mL do sobrenadante
- Ressuspender a sílica em 50 mL de água bidestilada
- Manter em repouso durante 5 h para sedimentar
- Desprezar 44 mL do sobrenadante
- Adicionar 100 μ L de HCl fumegante para ajustar o pH=2,0.
- Aliquotar

- **Solução L6**

- 120 g de isotiocianato de guanidina (GUSCN)
- 100 mL de TRIS-HCl 0,1 M pH 6,4
- 22 mL de EDTA 0,2 M pH 8,0
- 2,6 mL de Triton x-100

- **Solução L2**

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

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

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

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

- 0,2 mL de azul de bromofenol 1%
- 6,0 mL de SDS 10%
- 1 mL de 2-mercaptoetanol
- 2,5 mL de TRIS-HCl 0,5 M

- 6 g de ureia
- Água bidestilada q.s.p. 20 mL

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

- **Tampão de corrida para PAGE**
 - 3 g de TRIS (0,24 M)
 - 14,4 g de ácido aminoacético (glicina) ($\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$) (0,19 M)
 - Água bidestilada q.s.p. 1 litro

- **Tampão de estabilização para o rotavírus (TRIS/ Ca^{++}) 10 x - pH 7,2**
 - 12,12 g de TRIS (0,89 mM)
 - 2,2 g de cloreto de cálcio (1,5 mM)
 - Água bidestilada autoclavada q.s.p. 1 litro

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

- **SDS 10%**
 - 5 g de dodecil sulfato de sódio - Lauril sulfato de sódio - SDS ($\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_4\text{S}$)
 - Água bidestilada q.s.p. 50 mL

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

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

- **Solução Acrilamida / Bisacrilamida**
 - 0,8 g de bisacrilamida
 - 30 g de acrilamida
 - Água bidestilada q.s.p 100 mL

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

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

- **Solução reveladora para PAGE**
 - 9 g de hidróxido de sódio
 - 2,5 mL de formaldeído
 - 0,06 g de borohidreto de sódio
 - Água bidestilada q.s.p. 300 mL

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

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

- **Gel inferior (7,5%) da PAGE**
 - 5 mL de Lower TRIS
 - 3 mL de acrilamida/bisacrilamida
 - 50 µL de TEMED
 - 0,56 mL de persulfato de amônio 2%
 - 11,44 mL de água bidestilada
- **Gel superior (3,5%) da PAGE**
 - 2,5 mL de Upper TRIS
 - 1 mL de acrilamida/bisacrilamida
 - 100 µL de TEMED
 - 0,60 mL de persulfato de amônio 2%
 - 6,20 mL de água bidestilada
- **Gel de agarose 2%**
 - 1 g de agarose
 - 50 mL de tampão TBE 1x
 - 30 µL de brometo de etídeo
- **Diluição de dNTP**
 - solução estoque - concentração 100 mM
 - solução uso - concentração 10 mM - 10 µl da solução estoque + 90 µl de água ultrapura
- **Diluição dos *primers***

RT-PCR VP1

- *Primer VP1F forward*

Concentração: 14,68 nmol

Data de fabricação: Out.2011

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

$$14680 / 200 = 73,4 \text{ µL de água ultrapura}$$

- *Primer VP1IR reverse*

Concentração: 15,96 nmol

Data de fabricação: Out.2011

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

$$15960 / 200 = 79,8 \text{ } \mu\text{L de } \text{águas ultrapuras}$$

RT-PCR VP2

- *Primer VP2F forward*

Concentração: 20,28 nmol

Data de fabricação: Out.2011

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

$$20280 / 200 = 101,4 \text{ } \mu\text{L de } \text{águas ultrapuras}$$

- *Primer VP2IR reverse*

Concentração: 18,79 nmol

Data de fabricação: Out.2011

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

$$18790 / 200 = 93,95 \text{ } \mu\text{L de } \text{águas ultrapuras}$$

RT-PCR VP3

- *Primer VP3F forward*

Concentração: 16,66 nmol

Data de fabricação: Out.2011

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

$$16660 / 200 = 83,3 \text{ } \mu\text{L de } \text{águas ultrapuras}$$

- *Primer VP3IR reverse*

Concentração: 15,99 nmol

Data de fabricação: Out.2011

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

$$15990 / 200 = 79,95 \text{ } \mu\text{L de } \text{águas ultrapuras}$$

RT-PCR P (VP4) consensual

- *Primer Con 3 forward*

Concentração: 20,46 nmol

Data de fabricação: Jul.2009

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

$$20460 / 200 = 102,3 \text{ } \mu\text{L de } \text{água ultrapura}$$

- *Primer Con 2 reverse*

Concentração: 27,42 nmol

Data de fabricação: Dez.2008

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

$$27420 / 200 = 137,10 \text{ } \mu\text{L de } \text{água ultrapura}$$

RT-PCR VP6

- *Primer GEN_VP6F VP6 forward*

Concentração: 20,84 nmol

Data de fabricação: Out.2010

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

$$20840 / 200 = 104,2 \text{ } \mu\text{L de } \text{água ultrapura}$$

- *Primer GEN_VP6R reverse*

Concentração: 22,31 nmol

Data de fabricação: Out.2010

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

$$22310 / 200 = 111,55 \text{ } \mu\text{L de } \text{água ultrapura}$$

RT-PCR G (VP7) consensual

- *Primer Beg9 forward*

Concentração: 19,28 nmol

Data de fabricação: Set.2008

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

$$19280 / 200 = 96,4 \mu\text{L de água ultrapura}$$

- *Primer End 9 reverse*

Concentração: 22,52 nmol

Data de fabricação: Set.2008

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

$$22520 / 200 = 112,6 \mu\text{L de água ultrapura}$$

RT-PCR NSP1

- *Primer GEN_NSP1F forward*

Concentração: 18,9 nmol

Data de fabricação: Out.2010

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

$$18900 / 200 = 94,5 \mu\text{L de água ultrapura}$$

- *Primer GEN_NSP1R reverse*

Concentração: 19,75 nmol

Data de fabricação: Out.2010

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

$$19750 / 200 = 98,75 \mu\text{L de água ultrapura}$$

RT-PCR NSP2

- *Primer GEN_NSP2F forward*

Concentração: 22,54 nmol

Data de fabricação: Out.2010

$$22,54 \times 1000 = 22540 \text{ pmol}$$

$$22540 / 200 = 112,7 \mu\text{L de água ultrapura}$$

- *Primer GEN_NSP2R reverse*

Concentração: 21,89 nmol

Data de fabricação: Out.2010

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

$$21890 / 200 = 109,45 \mu\text{L de água ultrapura}$$

RT-PCR NSP3

- *Primer GEN_NSP3F forward*

Concentração: 21,4 nmol

Data de fabricação: Out.2010

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

$$21400 / 200 = 107 \mu\text{L de água ultrapura}$$

- *Primer GEN_NSP3R reverse*

Concentração: 36,22 nmol

Data de fabricação: Out.2010

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

$$36220 / 200 = 181,1 \mu\text{L de água ultrapura}$$

RT-PCR NSP4

- *Primer 10Beg.16 forward*

Concentração: 20,1 nmol

Data de fabricação: Out.2010

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

$$20100 / 200 = 100,5 \mu\text{L de água ultrapura}$$

- *Primer 10End.722 reverse*

Concentração: 20,86 nmol

Data de fabricação: Out.2010

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

$$20860 / 200 = 104,3 \mu\text{L de água ultrapura}$$

RT-PCR NSP5/6

- *Primer NSP5/6 forward*

Concentração: 20,75 nmol

Data de fabricação: Out.2010

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

$$20750 / 200 = 103,75 \text{ } \mu\text{L de } \text{águas ultrapuras}$$

- *Primer NSP5/6 reverse*

Concentração: 19,94 nmol

Data de fabricação: Out.2010

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

$$19940 / 200 = 99,7 \text{ } \mu\text{L de } \text{águas ultrapuras}$$

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

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

Concentração final: 20 pmol / μL

ANEXO C: Protocolo de técnicas

- **Suspensão fecal - Extração bruta**

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

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

- Aliquotar 500 µL da suspensão fecal
- Adicionar 50 µL de SDS 10 %
- Homogeneizar em vórtex
- Banho-maria 56 °C / 20 min
- Centrifugar 10.000 x g / 30 s
- Adicionar 500 µL de fenol/clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1)
- Homogeneizar em vórtex
- Banho-maria 56 °C / 15 min
- Homogeneizar em vórtex
- Centrifugar 10.000 x g / 10 min
- Recolher o sobrenadante em outro microtubo
- Adicionar 500 µL da solução L6
- Adicionar 25 µL de sílica hidratada
- Homogeneizar em vórtex
- Agitar em temperatura ambiente / 30 min
- Centrifugar 10.000 x g / 30 s
- Desprezar o sobrenadante em solução contendo NaOH 10 M
- Adicionar 500 µL de solução L2
- Homogeneizar em vórtex
- Centrifugar 10.000 x g / 30 s
- Desprezar o sobrenadante em solução contendo NaOH 10 M

- Adicionar 500 μ L de solução L2
- Homogeneizar em vórtex
- Centrifugar 10.000 x *g* / 30 s
- Desprezar o sobrenadante em solução contendo NaOH 10 M
- Adicionar 500 μ L de etanol 70% gelado
- Homogeneizar em vórtex
- Centrifugar 10.000 x *g* / 30 s
- Desprezar sobrenadante em descarte comum
- Adicionar 500 μ L de etanol 70% gelado
- Homogeneizar em vórtex
- Centrifugar 10.000 x *g* / 30 s
- Desprezar sobrenadante em descarte comum
- Adicionar 1000 μ L de acetona P.A. gelada
- Homogeneizar em vórtex
- Centrifugar 10.000 x *g* / 30 s
- Desprezar sobrenadante em descarte comum
- Secar o sedimento em termo bloco à 60°C (aproximadamente 2 min) ou banho-maria à 56°C (15 min)
- Adicionar 50 μ L de água DEPC
- Homogeneizar em vórtex
- Banho-maria 56°C / 15 min
- Homogeneizar em vórtex
- Centrifugar 13.000 x *g* / 4 min
- Recolher o sobrenadante em microtubo de 500 μ L
- Estocar à 4°C ou - 20°C até a utilização

Quadro 1. *Primers* consensuais - gene VP4 (P tipo) e VP7 (G tipo)

Genotipo	<i>Primer</i> consensual	Sequência (5'-3')	Posição / Polaridade	Produto pb	Referência
G	Beg9	GGCTTTAAAAGAGAGAATTTCCGTCTGG	1-28 (+)	1062	(1)
	End 9	GGTCACATCATAACAATTCTAATCTAAG	1062-1036 (-)		(1)
P	Con 3	TGGCTTCGCCATTTTATAGACA	11-32 (+)	877	(2)
	Con2	ATTTCGGACCATTTATAACC	887-868 (-)		(2)

(1) GOUVEA et al., 1990, (2) GENTSCH et al., 1992

Quadro 2. Primers utilizados para RT-PCR dos genes VP1-VP3, VP6, NSP1-NSP5/6.

Gene	Primer	Sequência (5'-3')	Polaridade	Posição (nt)	Produto (pb)	Referência
VP1	VP1F	GGCTATTAAGCTGTACAATGGG	(+)	1-23	686	Varghese et al., 2006
	VP1IR	TAATCCTCATGAGAAAACACTGAC	(-)	686-663		
VP2	VP2F	GGCTATTAAGGCTCAATGGCG	(+)	1-22	686	Varghese et al., 2006
	VP2IR	CTTCATCTTGAAATATAGCATCAC	(-)	686-663		
VP3	VP3F	GGCTATTAAGCAGTACCAGTAG	(+)	1-23	702	Varghese et al., 2006
	VP3IR	GTAAACATAGATTTCATTACGCGGACC	(-)	702-677		
VP6	GEN_VP6F	GGCTTTWAAACGAAGTCTTC	(+)	1-20	1356	Matthijnssens et al., 2008a
	GEN_VP6R	GGTCACATCCTCTCACT	(-)	1356-1340		
NSP1	GEN_NSP1F	GGCTTTTTTTTATGAAAAGTCTTG	(+)	1-23	1578	Matthijnssens et al., 2008a
	GEN_NSP1R	GGTCACATTTTATGCTGCC	(-)	1578-1560		
NSP2	GEN_NSP2F	GGCTTTTAAAGCGTCTCAG	(+)	1-19	1057	Matthijnssens et al., 2008a
	GEN_NSP2R	GGTCACATAAGCGCTTTC	(-)	1057-1041		
NSP3	GEN_NSP3F	GGCTTTTAATGCTTTTCAGTG	(+)	1-21	1077	Matthijnssens et al., 2008a
	GEN_NSP3R	ACATAACGCCCTATAGC	(-)	1073-1056		
NSP4	10BEG.16	TGTTCCGAGAGA GCGCGTG	(+)	16 -34	725	Lee et al., 2000
	10END.722	GACCATTCCTTCCATTAAC	(-)	740 -722		
NSP5/NSP6	NSP5/6F	GGCTTTAAAAGCGCATAGTGATGT	(+)	22-46	596	Mohan e Atreya, 2001
	NSP5/6R	GGTCACAAAACGGGAGTGGGGGAG	(-)	618-594		

- **RT-PCR para o rotavírus grupo A**

- **Mix desnaturação**

Mix Desnaturação VP4
con 2 (20 pmol) - 1 μ L con 3 (20 pmol) - 1 μ L Água ultrapura - 3 μ L
Volume final - 5 μ L

Mix Desnaturação VP7
Beg 9 (20 pmol) - 1 μ L End 9 (20 pmol) - 1 μ L Água ultrapura - 3 μ L
Volume final - 5 μ L

Mix Desnaturação VP1-VP3, VP6, NSP1-NSP5/6
<i>Primer forward</i> (20 pmol) - 1 μ L <i>Primer reverse</i> (20 pmol) - 1 μ L Água ultrapura - 3 μ L
Volume final - 5 μ L

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

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

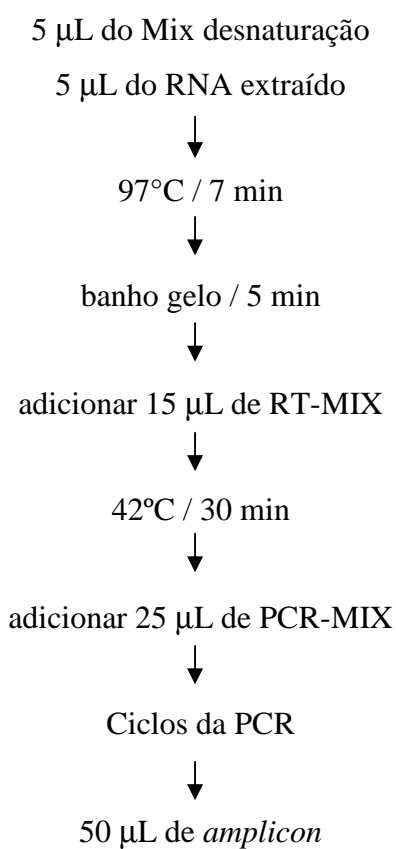
- Mix da reação em cadeia da polimerase (PCR-MIX)

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

Mix PCR VP7
Tampão 10 x pH 8,4 - 2,5 μ L dNTP 2,5 mM - 4 μ L <i>Platinum®Taq DNA Polymerase</i> 5 U / μ L - 0,25 μ L <i>Primer</i> Beg9 (20 pmol) - 1 μ L <i>Primer</i> End9 (20 pmol) - 1 μ L Água ultrapura - 16,25 μ L
Volume final - 25 μ L

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

Esquema da RT-PCR



Ciclos da PCR			
Ciclos	VP1, VP2, VP3, VP6, NSP1, NSP2, NSP3, NSP5/6	VP4 e VP7	NSP4
Desnaturação inicial	94°C / 3 min	94°C / 3 min	94°C / 3 min
Desnaturação	94°C / 1 min	94°C / 30 s	94°C / 45 s
Anelamento	55°C / 1 min	42°C / 30 s	49°C / 30 s
Extensão	72°C / 2 min	72°C / 45 s	72°C / 1,5 min
Nº de ciclos térmicos	30	40	30
Extensão final	72°C / 7 min	72°C / 7 min	72°C / 10 min

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

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

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

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

1. Pesar o fragmento excisado do gel em microtubo de 1,5 mL
2. Adicionar 10 µL do *Capture buffer type 2* para cada 10 mg de gel
3. Incubar o tubo a 60°C / 15 min, homogeneizando a cada 3 min
4. Centrifugar a 16.000 x g / 30s
5. Transferir 600 µL da amostra com o *Capture buffer type 2* em um tubo coletor com coluna
6. Incubar em temperatura ambiente por 1 min
7. Centrifugar a 16.000 x g / 30s
8. Descartar o filtrado e recolocar a coluna no mesmo tubo
9. Adicionar 500 µL do *Wash buffer type 1* na coluna com tubo coletor
10. Centrifugar a 16.000 x g / 30s
11. Descartar o filtrado e transferir a coluna para um microtubo de 1,5 mL
12. Adicionar 30 µL do *Elution buffer type 6*
13. Incubar a temperatura ambiente por 1 min
14. Centrifugar a 16.000 x g / 1 min
15. Estocar o DNA purificado em - 20°C

- **Quantificação de produto de PCR**

1. Preparar a solução *Quant-iT™ Working Solution* diluindo o reagente *Quant-iT™* no *Buffer Quant-iT™*, 1:200. São necessários 200 µL desta solução por amostra e para os padrões 0 e 100
2. Homogeneizar em vórtex

3. No microtubo das amostras adicionar 198 μL da solução *Quant-iTTM Working Solution* a 2 μL do DNA purificado
4. No microtubo do padrão 0 adicionar 190 μL da solução *Quant-iTTM Working Solution* a 10 μL do padrão 0
5. No microtubo do padrão 100 adicionar 190 μL da solução *Quant-iTTM Working Solution* a 10 μL do padrão 100
6. Homogeneizar os microtubos em vórtex por 2-3 s
7. Incubar os microtubos em temperatura ambiente por 2 min
8. Realizar a leitura usando *QubitTM fluorometer (InvitrogenTM Life Technologies, EUA)*
9. Multiplicar pelo fator de diluição para determinar a concentração correta da amostra

ANEXO D: Lista de softwares

- *Electropherogram quality analysis - Phred e CAP3*
(<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>)
- *BLAST The Basic Local Alignment Search Tool*
(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)
- *MEGA package software version 5.05*
(<http://www.megasoftware.net/mega5/mega5.html>)
- *BioEdit software version 7.1.3.0*
(<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>)
- *RotaC^{2.0} automated genotyping tool for Group A rotaviruses*
(<http://rotac.regatools.be>)