



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

FLÁVIA POSSATTI

**DIVERSIDADE DOS GENES VP6, VP7 E VP4 DE CEPAS DE
ROTAVÍRUS C IDENTIFICADAS EM REBANHOS SUÍNOS
BRASILEIROS**

Londrina
2014

FLÁVIA POSSATTI

**DIVERSIDADE DOS GENES VP6, VP7 E VP4 DE CEPAS DE
ROTAVÍRUS C IDENTIFICADAS EM REBANHOS SUÍNOS
BRASILEIROS**

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

Orientador: Prof. Dr. Amauri Alcindo Alfieri

Londrina
2014

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

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

P856d Possatti, Flávia.
Diversidade dos genes VP6, VP7 e VP4 de cepas de rotavírus C
identificadas em rebanhos suínos brasileiros / Flávia Possatti. –
Londrina, 2014.
66 f. : il.

Orientador: Amauri Alcindo Alfieri.
Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade
Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-
Graduação em Ciência Animal, 2014.
Inclui bibliografia.

1. Suíno – Doenças – Teses. 2. Diarreia em suínos – Teses. 3.
Rotavírus – Teses. 4. Virologia veterinária – Teses. 5. Genética
molecular – 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

FLÁVIA POSSATTI

**DIVERSIDADE DOS GENES VP6, VP7 E VP4 DE CEPAS DE
ROTAVÍRUS C IDENTIFICADAS EM REBANHOS SUÍNOS
BRASILEIROS**

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

BANCA EXAMINADORA

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

Prof.^a Dr.^a Marilda Carlos Vidotto
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof.^a Dr.^a Elisabete Takiuchi
Universidade Federal do Paraná – UFPR

Londrina, 04 de abril de 2014.

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

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

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

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e por guiar meus passos.

Aos professores Alice e Amauri Alfieri por me receberem generosamente desde os períodos de estágio durante a graduação e pela orientação no mestrado. Agradeço pela oportunidade, paciência, pelo conhecimento transmitido e exemplo de profissionais que são.

À professora Elisabete Takiuchi por ter sido minha “mãe” científica, pela paciência, amizade, ensinamentos, conversas e conselhos.

Aos professores que constituíram a banca de qualificação, Dr. Laurival Vilas Boas e de defesa, Dr.^a Elisabete Takiuchi e Dr.^a Marilda Carlos Vidotto.

A todos os professores do programa de pós-graduação em Ciência Animal pelo aprendizado acadêmico e científico.

À secretária Helenice pela ajuda e prestatividade nos momentos burocráticos e aos demais funcionários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva.

A todos da família Labviral por terem me acolhido e por contribuírem de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho. Em especial, aos doutorandos Elis e Otonel, pela ajuda fundamental no desenvolvimento do projeto.

Aos amigos e colegas de mestrado Dani, Wagner e Bruna pelos trabalhos em grupo, momentos de risadas, desabafos e reflexões.

Às minhas primeiras amigas de república, Cibele e Verônica, por me receberem tão bem em Londrina, pelos momentos de desabafos, risos e choros e por compartilharem seus conhecimentos profissionais. E as atuais amigas de república, Ana Paula e Bethânia, por suportarem meu “humor matinal”, pelos inúmeros momentos de descontração e risadas incontroláveis.

Ao meu namorado, José Carlos, que se faz presente mesmo a distância e compreende que o afastamento é temporário e necessário. Agradeço a ele por dividir sonhos, anseios, medos e frustrações e pela motivação constante.

A toda minha família que sempre me apoiou e incentivou nas minhas decisões, e principalmente aos meus pais, Clarice e Vilmar Possatti, por sempre acreditarem em mim, pelo carinho e suporte.

“O cientista não estuda a natureza porque ela é útil; ele a estuda porque se deleita nela, e se deleita nela porque ela é bela. Se a natureza não fosse bela, não valeria a pena ser conhecida, e se não valesse a pena ser conhecida, a vida não valeria a pena ser vivida.”

Henry Poincaré

RESUMO

POSSATTI, Flávia. **Diversidade dos genes VP6, VP7 e VP4 de cepas de rotavírus C identificadas em rebanhos suínos brasileiros.** 2014. 66 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal; Área de Concentração: Sanidade Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2014.

RESUMO

O rotavírus C (RVC) suíno é uma importante causa de enterite, principalmente em leitões lactentes e elevada incidência desta infecção tem sido demonstrada em rebanhos suínos brasileiros. Para investigar a diversidade genética do RVC suíno em rebanhos de seis estados das três principais regiões brasileiras produtoras de suíno, os genes VP6, VP7 e VP4 de 15 amostras de fezes diarreicas positivas para RVC foram amplificadas, sequenciadas e a filogenia foi analisada em comparação com outras sequências de RVC disponíveis em bases públicas de dados. A análise do gene VP6 demonstrou heterogeneidade considerável entre as 15 amostras, que apresentaram 83,2-100% de identidade de nucleotídeo (nt) entre elas e 82,6-98% de identidade com outras cepas de RVC suíno. Na árvore filogenética as cepas de campo do RVC suíno agruparam em duas linhagens distintas (*Porcine I* e *Porcine II*) do genótipo suíno I1. A análise do gene VP7 revelou que a maioria das amostras ($n = 14$) pertence ao genótipo G6 e demonstrou alta identidade de nt entre elas (88,2-100%). No entanto, a amostra de RVC BRA57/11 não apresentou alta similaridade (74,5-76,7% de identidade de nt) com as demais amostras e agrupou com a cepa protótipo Cowden, que representa o genótipo G1. Na análise do gene VP4 as 15 amostras de RVC demonstraram grande heterogeneidade genética, com 60,7-100% de identidade de nt entre elas. Com base em um ponto de corte de $\geq 80\%$, além do genótipo P[1] representado pela cepa Cowden, outros três genótipos suínos podem ser descritos. Sugerimos nomear como genótipo P[4] as cepas sul-coreanas (CUK-5 e CUK-6) anteriormente identificadas e como genótipo P[5] a cepa norte-americana RV0143/1 recentemente identificada. Na árvore filogenética a amostra brasileira BRA77/11 agrupou no mesmo ramo das cepas P[4], CUK-5 e CUK-6. A amostra BRA57/11 agrupou no mesmo ramo da cepa Cowden, mas apresentou menos de 80% de identidade nt (74,4%), representando um possível novo genótipo, provisoriamente denominado P[6]. As outras 13 amostras agruparam com a cepa RV0143/11, com identidade de nt de 83,3-87,3%, indicando que a maioria das cepas de RVC suíno deste estudo pertence ao genótipo provisoriamente denominado P[5]. Esses resultados evidenciam grande diversidade nos genes VP6, VP7 e VP4 de cepas de campo de RVC suíno no Brasil, incluindo a descrição de um potencial novo genótipo VP4. Esse estudo contribui com informações moleculares para o estabelecimento de um sistema formal de classificação e para obtenção de conhecimento sobre a ecologia e evolução das cepas de RVC circulantes em todo o mundo.

Palavras-chave: Leitões. Diarreia. RVC. Genótipos

ABSTRACT

POSSATTI, Flávia. **Diversity of VP6, VP7, and VP4 genes of rotavirus C strains identified in Brazilian pig herds.** 2014. 66 p. Dissertation (Master Degree in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2014.

ABSTRACT

Porcine C rotavirus (RVC) is an important cause of enteritis, mainly in nursing piglets, and a high incidence of this infection has been demonstrated in Brazilian pig herds. To investigate the genetic diversity of porcine RVC in herds from six states from three major Brazilian pig-producing regions, the VP6, VP7, and VP4 genes of 15 RVC-positive diarrheic fecal samples were amplified, sequenced, and the phylogeny was analyzed in comparison with other RVC sequences available in public databases. The VP6 gene analysis demonstrated a considerable heterogeneity between the 15 RVC samples, that showed 83.2 to 100% of nucleotide (nt) identity to each other and 82.6 to 98% nt identity to other porcine RVC strains. In the phylogenetic tree the Brazilian porcine RVC field strains clustered in two distinct lineages (Porcine I and Porcine II), of the porcine genotype I1. Analysis of the VP7 gene, revealed that most samples ($n = 14$) were G6 genotype and shared high nt identity with each other (88.2-100%). However, the RVC sample BRA57/11 were not closely related (74.5-76.7% nt identity) with the other samples, and clustered with the prototype Cowden strain, which represent the G1 genotype. In the VP4 gene analysis the 15 RVC samples demonstrated a high genetic heterogeneity, with 60.7 to 100% nt identity with each other. Based on a cutoff value of 80%, three porcine genotypes can be described besides of Cowden P[1]. We suggest to nominate the previous identified South Korean strains (CUK-5 and CUK-6) as P[4] genotype and the recently described North American RV0143/11 strain as P[5] genotype. In the phylogenetic tree the Brazilian sample BRA77/11 grouped in the same branch of P[4] CUK-5 and CUK-6 strains. The sample BRA57/11 grouped in the same branch of Cowden strain, but shared less than 80% of nt identity (74.4%), representing a possible new genotype, tentatively named P[6]. The others 13 samples grouped together with RV0143/11 strain, with a nt similarity of 83.3 to 87.3%, indicating that most of porcine RVC strains from this study were from the putative P[5] genotype. The results show the occurrence of the wide diversity in VP6, VP7, and VP4 genes in porcine RVC Brazilian field strains, including the description of a potential new VP4 genotype. This study contributes with molecular information to establishment of a formal classification system and to obtain information on ecology and evolution of the RVC strains circulating throughout the world.

Keywords: Piglets. Diarrhea. RVC. Genotypes

Revisão de literatura

- Figura 1** – Representação esquemática da estrutura e composição das camadas interna, intermediária e externa do capsídeo dos rotavírus.....16

Artigo para publicação

- Figure 1** – Neighbor-joining trees based on the nucleotide sequences of RVC VP6 (A), VP7 (B), and VP4 (C) genes from porcine rotavirus C samples described in this study and another strains acquired from GenBank. The shape markers of porcine RVC strains detected in this study are in accordance to the pig herd location (MG [◆], MS [●], PR [■], RS [▲], SC [▼], SP [◇]). The numbers adjacent to the nodes represent the percentage of bootstrap support (of 1,000 replicates) for the clusters to the right of node. Bootstrap values lower than 50% are not shown. Bo: bovine; Hu: human; Po: porcine.43

Artigo para publicação

Table 1 – Brazilian porcine RVC wild-type strains with VP6, VP7, and VP4 genes sequences performed in this study, their geographical region, state and herd of origin.....46

LISTA DE QUADROS

Revisão de literatura

- Quadro 1** – Proteína codificada por cada segmento genômico dos rotavírus e suas respectivas localizações e funções17
- Quadro 2** – Valores de ponto de corte (percentual de identidade de nucleotídeo) que definem os genótipos para os 11 segmentos genômicos do rotavírus A e o número de genótipos (n) já identificados18
- Quadro 3** – Frequência de detecção do rotavírus C em fezes de suínos com ou sem diarreia, de acordo com o país de origem das amostras analisadas20

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aa	Aminoácido
ABIEPCS	Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
DEPC	Dietil-pirocarbonato
dNTP	Desoxinucleotídeo-trifosfato
dsRNA	<i>Double-strand RNA</i> (Ácido ribonucleico fita dupla)
IFN	Interferon
<i>N</i>	Número total de amostras
nm	Nanômetro
NSP	Proteína não-estrutural
nt	Nucleotídeo
NTPase	Nucleosídeo trifosfatase
ORF	<i>Open reading frame</i> (Fase aberta de leitura)
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
pb	Pares de base
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase precedida por transcrição reversa
RV	Rotavírus
RVA	Rotavírus A
RVB	Rotavírus B
RVC	Rotavírus C
T	Tonelada
VP	Proteína viral

SUMÁRIO

1	REVISÃO DE LITERATURA	13
1.1	INTRODUÇÃO	14
1.2	ROTAVÍRUS SUÍNO C.....	19
1.3	REFERÊNCIAS.....	23
2	OBJETIVOS	31
2.1	OBJETIVO GERAL.....	32
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
3	ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO	33
3.1	GENETIC HETEROGENEITY OF PORCINE ROTAVIRUS C IDENTIFIED IN BRAZILIAN FIELD STRAINS AND EVIDENCE OF A PUTATIVE NEW P-GENOTYPE	34
	REFERÊNCIAS	47
	CONCLUSÕES	51
	ANEXOS	53
	ANEXO A – Lista de reagentes	54
	ANEXO B – Soluções e Tampões	56
	ANEXO C – Protocolos e Técnicas.....	60
	ANEXO D – Lista de Softwares	66

1. REVISÃO DE LITERATURA

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 INTRODUÇÃO

A suinocultura é um segmento consolidado do agronegócio brasileiro. No cenário mundial o Brasil representa um importante produtor e exportador da carne suína, ocupando o quarto lugar no *ranking* mundial. Segundo a Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína (ABIEPCS), no ano de 2012, o Brasil produziu aproximadamente, 3,4 milhões t de carne suína e exportou para 69 países o total de 580 mil t. O mercado interno absorveu a maior parte da produção, sendo considerado a base de sustentação da suinocultura brasileira (ABIEPCS, 2013).

Para atender a crescente demanda, tanto do mercado interno quanto do externo, a cadeia produtiva da carne suína tem investido cada vez mais na modernização do sistema de produção (ABIEPCS, 2013). Entretanto, o manejo intensivo adotado na produção de suínos torna os animais mais susceptíveis a infecções, especialmente nas fases de maternidade e creche, ocasionando redução da eficiência produtiva do rebanho. Dentre as principais enfermidades que podem acometer os suínos nas primeiras semanas de vida destaca-se a diarreia (SILVA et al., 1998; ALFIERI et al., 2012).

Na suinocultura mundial as diarreias neonatais constituem importante causa de morbidade e mortalidade em leitões. Episódios de diarreia tanto na maternidade quanto no pós-desmame podem resultar em aumento nos custos de produção, em consequência de gastos adicionais com mão de obra e medicamentos, além da redução no ganho de peso dos leitões mais comprometidos, dificultando a formação de lotes homogêneos à desmama (ALFIERI; ALFIERI; BARRY, 2010; SILVA et al., 1998; LINARES et al., 2009; ALFIERI et al., 2012).

Segundo Tagliari e Brito (1998) a primeira semana de vida dos leitões é a de maior ocorrência da doença e aquela em que ocorre maior redução do ganho de peso diário e mortalidade. Nas leitegadas em que 100% dos leitões apresentaram gastroenterite exclusivamente na primeira semana, houve redução em 21% no ganho de peso médio diário.

A etiologia da diarreia neonatal é multifatorial e multietiológica, estando envolvidos fatores ambientais, nutricionais, imunológicos e diferentes

classes de agentes etiológicos, como bactérias, parasitas e vírus, além de toxinas bacterianas (BRITO et al., 1995; TAGLIARI; BRITO, 1998; CALDERARO et al., 2001; KATSUDA et al., 2006; ALFIERI et al., 2012).

O rotavírus (RV) é uma das principais etiologias virais de diarreia em crianças e em várias espécies de mamíferos e aves em todo o mundo (ESTES; KAPIKIAN, 2007, ALFIERI et al., 2012). Em animais de produção, a infecção pelo RV assume especial importância devido ao impacto econômico que representa ao setor produtivo (ALFIERI; ALFIERI; BARRY, 2010).

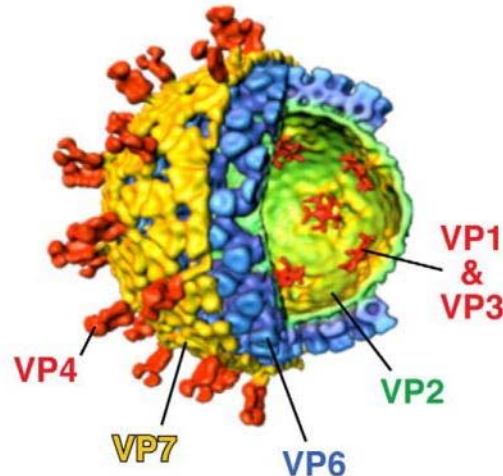
A infecção pelo RV pode ser sintomática ou assintomática e a gravidade da doença está relacionada à virulência da cepa infectante, carga viral, além de fatores ambientais e envolvimento de enteropatógenos secundários (PAUL; LYOO, 1993). A transmissão do RV ocorre pela via fecal-oral, por meio da ingestão de água ou alimentos contaminados com o vírus (ESTES; KAPIKIAN, 2007). No entanto, a transmissão por via aérea também tem sido sugerida (COOK et al., 1990; CRAWFORD et al., 2006). O RV possui tropismo pelos enterócitos maduros do intestino delgado (LUNDGREN; SVENSSON, 2001) e a diarreia ocorre por má absorção devido à lise destas células, diminuição da secreção de enzimas digestivas, alteração funcional das junções celulares, além da produção da enterotoxina viral NSP4 (GREENBERG; ESTES, 2009).

Em leitões, as diarreias ocorrem tanto em animais lactentes quanto recém-desmamados. As fases de maternidade e creche representam o período de maior desafio à sanidade entérica dos leitões (KATOULI et al., 1995). A imaturidade imunológica, dificuldade de acesso ao colostro, ou ingestão de colostro com baixos títulos de anticorpos rotavírus-específicos são os principais fatores que tornam os animais lactentes susceptíveis (DEWEY et al., 1995; KATSUDA et al., 2006). Na fase pós-desmame, as alterações de ordem social e alimentar constituem fatores de risco para o aparecimento de diarreia (FITZGERALD et al., 1988; ALFIERI et al., 2012). Nessas fases de produção a frequência da infecção pelo RV pode variar de 4,7% a mais de 80%, sendo que as maiores taxas de morbidade ocorrem nas primoinfecções (YUAN; STEVENSON; SAIF, 2006).

O RV pertence ao gênero *Rotavirus* da família *Reoviridae*. Os vírions, de aproximadamente 75-100 nm de diâmetro, são desprovidos de envelope e apresentam capsídeo icosaédrico composto por três camadas proteicas concêntricas denominadas camada interna, intermediária e externa (Figura 1). O

genoma viral é constituído por 11 segmentos de RNA fita dupla (dsRNA) (ESTES; KAPIKIAN, 2007).

Figura 1 – Representação esquemática da estrutura e composição das camadas interna, intermediária e externa do capsídeo dos rotavírus.



Fonte: Greenberg e Estes (2009)

Cada segmento genômico é monocistrônico, ou seja, codifica apenas uma proteína viral, com exceção do segmento 11, que codifica duas proteínas, totalizando seis proteínas estruturais (VP1-VP4, VP6, e VP7) e 6 proteínas não-estruturais (NSP1-NSP6) (Quadro 1) (ESTES; KAPIKIAN, 2007).

De acordo com as diferenças antigênicas e moleculares da proteína VP6, os RV são classificados em 5 grupos / espécies (A-E) aceitos pelo Comitê Internacional de Taxonomia Viral (ICTV) e 2 grupos / espécies propostos (F e G) (ATTOUI et al., 2012). Recentemente, Matthijssens et al. (2012) propuseram a criação de um novo grupo / espécie, denominado rotavírus H.

As espécies A, B, C e H já foram descritas em seres humanos e em outros animais (ESTES; COHEN, 1989; JIANG et al., 2008; NAGASHIMA et al., 2008). A infecção pelo rotavírus E foi relatada apenas em suínos (PEDLEY et al., 1986). As espécies D, F, e G foram identificadas exclusivamente em aves (OTTO et al., 2006; McNULTY et al., 1980; TROJNAR et al., 2010).

Quadro 1 –Proteína codificada por cada segmento genômico dos rotavírus e suas respectivas localizações e funções.

GENE	PROTEÍNA	LOCALIZAÇÃO NAS PARTÍCULAS	FUNÇÕES / PROCESSO BIOLÓGICO
1	VP1	Nucleocapsídeo	RNA polimerase RNA-dependente.
2	VP2	Nucleocapsídeo	União ao RNA; forma o nucleocapsídeo.
3	VP3	Nucleocapsídeo	Guanililtransferase; metiltransferase.
4	VP4	Camada externa do capsídeo	Proteína de ligação à célula hospedeira; indução de anticorpos neutralizantes.
	VP5*/VP8*	Produtos da clivagem da VP4	Aumentam a infectividade do vírus; VP5 permeabiliza membranas.
5	NSP1	Proteína não estrutural	Associa-se ao citoesqueleto; interage com fator 3 regulatório de IFN.
6	VP6	Camada intermediária do capsídeo	Forma a camada intermediária do capsídeo; antígeno de grupo.
7	NSP3	Proteína não estrutural	Envolvida na regulação da tradução.
8	NSP2	Proteína não estrutural	Acumula-se no viroplasma; atividade NTPase.
9	VP7	Camada externa do capsídeo	Glicoproteína estrutural da camada externa do capsídeo; indução de anticorpos neutralizantes.
10	NSP4	Proteína não estrutural	Enterotoxina; receptor para partículas com capsídeo de camada dupla no retículo endoplasmático.
11	NSP5	Proteína não estrutural	Possível cinase autolítica
	NSP6	Proteína não estrutural	Produto da ORF 2 do gene 11; localizada em viroplasmata.

Fonte: Adaptado de Alfieri et al. (2012).

Dentre as espécies de RV, o rotavírus A (RVA) é o mais frequente causador de diarreia em humanos e outros animais. Os episódios de diarreia causados por rotavírus B (RVB) e C (RVC) são menos frequentes (ESTES; KAPIKIAN, 2007; SAIF, 1989; ALFIERI et al., 2012).

Uma classificação sorológica binária é adotada para o RVA, considerando as especificidades antigênicas da glicoproteína VP7 (G tipo) e da proteína protease sensível VP4 (P tipo). Entretanto, a classificação antigênica tem sido substituída pela genotípica (G e P genótipos) em decorrência da dificuldade de execução dos testes sorológicos e o uso cada vez mais frequente do sequenciamento genético (HOSHINO et al., 1985; OFFIT et al., 1986; ESTES; KAPIKIAN, 2007; MATTHIJNSSENS et al., 2008; ALFIERI et al., 2012).

Devido à grande diversidade genética encontrada nas cepas de RVA e à possibilidade de ocorrência de *reassortment* em todos os segmentos do genoma, um novo sistema de classificação com base nos 11 genes foi proposto e os genótipos adotados para as proteínas VP7-VP4-VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5/6 foram Gx-P[x]-Ix-Rx-Cx-Mx-Ax-Nx-Tx-Ex-Hx, respectivamente (Quadro 2). Para cada gene foram estabelecidos os valores de ponto de corte apropriados, sendo que a adoção da identidade de nucleotídeo (nt) foi considerada mais confiável que a identidade de aminoácido (aa) (MATTHIJNSSENS et al., 2008).

Quadro 2 –Valores de ponto de corte (percentual de identidade de nucleotídeo) que definem os genótipos para os 11 segmentos genômicos do rotavírus A e o número de genótipos (*n*) já identificados.

Produto gênico	Ponto de corte (% identidade de nt)	Genótipos (<i>n</i>)	Descrição do produto gênico
VP7	80	G (27)	Glicoproteína
VP4	80	P (37)	Sensível à Protease
VP6	85	I (17)	Capsídeo Intermediário
VP1	83	R (9)	RNA polimerase RNA dependente
VP2	84	C (9)	Proteína do Core
VP3	81	M (8)	Metiltransferase
NSP1	79	A (18)	Antagonista do IFN
NSP2	85	N (10)	NTPase
NSP3	85	T (12)	Translation Enhancer
NSP4	85	E (15)	Enterotoxina
NSP5	91	H (11)	Fosfoproteína

Fonte: Adaptado de Matthijnsens et al. (2008); Matthijnsens et al. (2011); Guo et al. (2012); Papp et al. (2012); Trojnar et al. (2013); Jere et al. (2014).

1.2 ROTAVÍRUS SUÍNO C

O RVC foi identificado pela primeira vez em 1980, nos Estados Unidos da América (EUA), em um leitão de 27 dias de idade com diarreia (SAIF et al., 1980). Como à microscopia eletrônica o agente etiológico apresentava morfologia semelhante aos RV, porém sem relação antigênica com as cepas já descritas, o vírus foi inicialmente denominado como pararotavírus, rotavírus atípico, ou ainda rotavírus não-grupo A (BRIDGER, 1987; SAIF, 1989).

Em seguida, o RVC também foi identificado como importante enteropatógeno em humanos (RODGER; BISHOP; HOLMES, 1982) e em outras espécies animais, incluindo bovinos (TSUNEMITSU et al., 1991), cães (OTTO et al., 1999) e furões (TORRES-MEDINA, 1987).

Em humanos, o RVC é a segunda espécie de RV mais frequente e está associado a casos esporádicos e surtos de gastroenterite em todo o mundo. Ao contrário do RVA que acomete principalmente crianças com menos de três anos de idade, o RVC geralmente causa doença em crianças maiores de três anos e em adultos (SZUCS; KENDE; UJ, 1987; ARISTA et al., 1990; CAUL et al., 1990; JIANG et al., 1995; KUZUYA et al., 1998; SÁNCHEZ-FAUQUIER et al., 2003; ESONA et al., 2008).

Estudos sorológicos demonstram alta soroprevalência do RVC em rebanhos suínos de todo o mundo (BRIDGER; BROWN, 1985; BRIDGER 1987; TERRET et al., 1987; SAIF, 1989). Taxas de soroprevalência de 93% e 97% foram encontradas em suínos adultos no Japão e EUA, respectivamente (TSUNEMITSU; JIANG; SAIF, 1992). Em um estudo conduzido por Terret et al. (1987), soros de suínos de diferentes categorias foram analisados e a soroprevalência encontrada variou de 59 a 86% em leitões, aumentando com a idade, chegando a alcançar 100% em suínos adultos.

O dsRNA do RVC tem sido identificado em amostras fecais diarreicas de suínos em diferentes faixas etárias e a infecção pode ocorrer tanto de forma isolada quanto em associação com outros enteropatógenos (ALFIERI et al., 1999a; KIM et al., 1999; MARTELLA et al., 2007a; MARTELLA et al., 2007b; JEONG et al., 2009; MÉDICI et al., 2010; LEE et al., 2011; MÉDICI et al., 2011; AMIMO; VLASOVA; SAIF, 2013; MARTHALER et al., 2013; MOUTELÍKOVÁ;

PRODELALOVÁ; DUFKOVÁ, 2013; LORENZETTI et al., 2014). O quadro 3 apresenta dados relativos às frequências de detecção do RVC em suínos.

O RVC também já foi detectado em leitões assintomáticos, com prevalência de 4,4%. De acordo com os autores, estes casos podem estar associados à imunidade materna ou à circulação de cepas naturalmente atenuadas (COLLINS; MARTELLA; O'SHEA, 2008).

Apesar da diarreia causada pelo RVC ser mais frequente em leitões na fase de maternidade e creche (LEE et al., 2011; MÉDICI et al., 2011; AMIMO, VLASOVA; SAIF, 2013; MARTHALER et al., 2013; MOUTELÍKOVÁ; PRODELALOVÁ; DUFKOVÁ, 2013), surtos de diarreia em suínos adultos, com altas taxas de morbidade (60-80%), foram relatados em rebanhos de Michigan, EUA (KIM et al., 1999).

Quadro 3 – Frequência de detecção do rotavírus C em fezes de suínos com ou sem diarreia, de acordo com o país de origem das amostras analisadas.

PAÍS	TÉCNICA	AMOSTRAS		REFERÊNCIA
		TOTAL	POSITIVAS (%)	
Austrália	PAGE	237	7 (2,95)	Nagesha et al. (1981)
EUA	PAGE	90	10 (11,1)	Janke et al. (1990)
Canadá	PAGE	120	6 (5)	Magar, Robinson e Morin (1991)
EUA	PAGE	1048	5 (0,19)	Will et al. (1994)
África do Sul	PAGE	172	7 (4,1)	Geyer et al. (1996)
Tailândia	PAGE	557	2 (0,3)	Pongsuwanna et al. (1996)
Japão	PAGE	845	29 (3,4)	Sanekata et al. (1996)
Itália	RT-PCR	188	54 (28,7)	Martella et al. (2007)
Irlanda	RT-PCR	292	13 (4,4)	Collins, Martella e O'shea (2008)
Coréia do Sul	RT-PCR	137	36 (26,2)	Jeong et al. (2009)
Coréia do Sul	RT-PCR	166	2 (1,2)	Lee et al. (2011)
Brasil	RT-PCR	144	33 (22,9)	Médici et al. (2011)
EUA	RT-PCR	380	74 (19,5)	Amimo, Vlasova e Saif (2013)
EUA e Canadá	RT-PCR	7520	3447 (46)	Marthaler et al. (2013)
República Tcheca	RT-PCR	293	75 (25,6)	Mouteliková, Prodelalová e Dufková (2013)

PAGE= eletroforese em gel de poliacrilamida; RT-PCR= Reação em cadeia da polimerase precedida de transcrição reversa

Morin, Magar e Robinson (1990) demonstraram que o RVC foi o único agente etiológico encontrado em um surto de diarreia que iniciou 24-48 horas após o nascimento de leitões em uma granja no Canadá, com taxas de mortalidade de 5-10% e morbidade de 100%.

Os RV são geralmente espécie-específicos (ESTES; KAPIKIAN, 2007), porém a ocorrência de infecções por RVC entre diferentes espécies animais, denominadas infecções heterólogas, tem sido relatada, como a detecção de uma cepa (WD534tc) de RVC *porcine-like* em bovino (CHANG et al., 1999), e outra cepa (06-48-2) de RVC *bovine-like* em suíno (JEONG et al., 2009). Além disso, em um estudo epidemiológico longitudinal, uma cepa *porcine-like* foi detectada em crianças brasileiras, evidenciando o potencial zoonótico do RVC suíno (GABBAY et al., 2008)

A habilidade do RVA causar viremia tem sido relatada em alguns animais e a excreção do vírus pela via respiratória possivelmente está relacionada à viremia (AZEVEDO et al., 2005; CRAWFORD et al., 2006). Recentemente, o RV suíno foi detectado em 343/635 (54%) amostras de pulmões que apresentavam lesões histológicas de bronquiolite e alveolite e que foram negativas nas pesquisas de patógenos frequentemente associados às doenças respiratórias em suínos. Nessas amostras, o RVA foi a espécie mais frequente (50%), seguido pelo RVC (10%) e RVB (5%). Esta foi a primeira detecção do RVC em tecido pulmonar, mas sem comprovação de viremia ou replicação deste vírus no pulmão (MARTHALER et al., 2013).

Assim como ocorre para o RVA, o RVC também tem sido classificado em genótipos. Recentemente, Marthaler et al. (2013) com base nas frequências de identidade observadas em sequências do gene VP7 disponíveis em bases públicas de dados, sugeriram o valor de identidade de nt $\geq 85\%$ como ponto de corte para a classificação de cepas do RVC dentro de um mesmo genótipo G. Utilizando essa sistemática os autores identificaram nove G-genótipos (G1-G9) em cepas de RVC. O genótipo G4 agrupa apenas as cepas de RVC humanas já descritas, uma vez que apresentam alto grau de similaridade entre elas. As cepas de RVC bovinas estão classificadas no genótipo G2. Já as cepas de RVC suínas demonstram grande variabilidade genética e são divididas em 7 genótipos (G1, G3, e G5-G9).

O genótipo detectado com maior frequência nos EUA e Canadá foi o G6 (70%), seguido pelo G5 (17%) e G1 (12%), sendo que na maioria das granjas

avaliadas ($n = 26$) apenas um genótipo foi detectado, mas em quatro granjas dois genótipos distintos foram encontrados co-circulando (MARTHALER et al., 2013).

Até o momento, em relação aos demais genes do RVC, não existe um sistema formal para a classificação em genótipos. Portanto, os critérios determinados para o RVA (MATTHIJNSSENS et al., 2008) têm sido provisoriamente adotados para o RVC.

O gene VP6 do RVC é classificado em três genótipos (I1-I3) (YAMAMOTO et al., 2011). No genótipo I1 estão agrupadas as cepas suínas, enquanto o genótipo I3 é constituído pelas cepas bovinas. As cepas humanas apresentam alto grau de conservação (GRICE et al., 1994; JIANG et al., 1996; RAHMAN et al., 2005) e são classificadas no genótipo I2. As análises moleculares das cepas suínas têm demonstrado certo grau de variabilidade genética, com isso, duas linhagens distintas (Porcine I e Porcine II) dentro do genótipo I1 têm sido sugeridas (MARTELLA et al., 2007a; JEONG et al., 2009; MÉDICI et al., 2010; LEE et al., 2011; MOUTELÍKOVÁ; PRODELALOVÁ; DUFKOVÁ, 2013).

A classificação em três genótipos também foi adotada para o gene VP4 (P[1]-P[3]) do RVC (JIANG et al., 1999; YAMAMOTO et al., 2011). A cepa protótipo suína (Cowden) pertence ao genótipo P[1] e os genótipos P[2] e P[3] agrupam as cepas humanas e bovinas, respectivamente. Recentemente, duas cepas (CUK-5 e CUK-6) de origem suína detectadas na Coreia do Sul, demonstraram baixa identidade de nt com a cepa Cowden (71,1 e 70,1%) e, conseqüentemente, agruparam-se em um ramo claramente distinto (LEE et al., 2011). Estes resultados indicam que as cepas sul coreanas podem pertencer a um novo P-genótipo. Adicionalmente, a cepa RV0143/11 descrita nos EUA, possivelmente seja representante de outro novo P-genótipo (AMIMO, VLASOVA e SAIF, 2013). Porém, até o momento, ainda não foram atribuídos genótipos para estas três cepas.

Esses estudos demonstram que as informações a respeito do RVC, são limitadas quando comparadas ao RVA. Desta forma, é fundamental a investigação dos genótipos do RVC circulantes para auxiliar na compreensão dos eventos de *reassortment* genético e de transmissão interespecíes, além de elucidar as características epidemiológicas e evolutivas do vírus.

1.3 REFERÊNCIAS

- ALFIERI, A.A.; ALFIERI, A.F.; BEUTTEMULLER, E.A.; BRITO, B.G.; MEDICI, K.C. Aspectos epidemiológicos da rotavirose suína na região sudoeste do estado do Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**, v.20, n.1, p.5-11, 1999a.
- ALFIERI, A.A.; LEITE, J.P.G.; ALFIERI, A.F.; JIANG, B.; GLASS, R.I.; GENTSCH, J.R. Detection of field isolates of human and animal group C rotavirus by reverse transcription-polymerase chain reaction and digoxigenin-labeled oligonucleotide probes. **Journal of Virological Methods**, v.83, p.35-43, 1999b.
- ALFIERI, A.A.; ALFIERI, A.F.; BARRY, A, F. Diarreias em suínos. In: ALBERTON, G.C.; ZOTTI, E. (Org.). **Tópicos em sanidade e manejo de suínos**. Campinas: Sanphar; Sorocaba: Conciência Ecológica, 2010. p.165-206.
- ALFIERI, A.A.; ALFIERI, A.F.; MATOS, A.C.D.; LORENZETTI, E.; LOBATO, Z.I.P. Reoviridae. In FLORES, E.F. (Org.). **Virologia Veterinária**. 2.ed. Santa Maria: Editora da UFSM, 2012. p. 898-941.
- AMIMO, J.O.; VLASOVA, A.N.; SAIF, L.J. Prevalence and genetic heterogeneity of porcine group C rotaviruses in nursing and weaned piglets in Ohio, USA and identification of a potencial new VP4 genotype. **Veterinary Microbiology**, v. 164, p.27-38, 2013.
- ARISTA, S.; GIOVANNELLI, L.; PISTOIA, D.; CASCIO, A.; PAREA, M.; GERNA, G. Electropherotypes, subgroups and serotypes of human rotavirus strains causing gastroenteritis in infants and young children in Palermo, Italy, from 1985 to 1989. **Research in Virology**, v.141, p.435–448, 1990.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA PRODUTORA DE E EXPORTADORA DE CARNE SUÍNA – ABIPECS. Disponível em < <http://www.abipecs.com.br/>> Acesso em: 28 fev. 2014.
- ATTOUI, H.; MERTENS, P.P.C.; BECNEL, J.; BELAGANAHALLI, S.; BERGOIN, M.; BRUSSAARD, C.P.; CHAPPELL, J.D.; CIARLET, M.; DEL VAS, M.; DERMODY, T.S.; DORMITZER, P.R.; DUNCAN, R.; FANG, Q.; GRAHAM, R.; GUGLIELMI, K.M.; HARDING, R.M.; HILLMAN, B.; MAKKAY, A.; MARZACHI, C.; MATTHIJNSSENS, J.; MILNE, R.G.; JAAFAR, F.M.; MORI, H.; NOORDELOOS, A.A.; OMURA, T.; PATTON, J.T.; RAO, S.; MAAN, M.; STOLTZ, D.; SUZUKI, N.; UPADHYAYA, N.M.; WEI, C.; ZHOU, H. Family: Reoviridae. In: KING, A.M.Q.; ADAMS, M.J.; CARSTENS, E.B.; LEFKOWITZ, E.J. (Eds.), **Virus Taxonomy: Ninth Report of the ICTV**. Elsevier Academic Press, Amsterdam, p.541–637, 2012.
- AZEVEDO, M.S.; YUAN, L.; JEONG, K.I.; GONZALEZ, A.; NGUYEN, T.V.; POULY, S.; GOCHNAUER, M.; ZHANG, W.; AZEVEDO, A.; SAIF, L.J. Viremia and nasal and rectal shedding of rotavirus in gnotobiotic pigs inoculated with Wa human rotavirus. **Journal of Virology**, v.79, p.5428–5436, 2005.
- BRIDGER, J.C.; BROWN, J.F. Prevalence of antibody to typical and atypical rotaviruses in pigs. **Veterinary Record**, v.116, n.2, p.50, 1985.

BRIDGER, J.C. Novel rotaviruses in animals and man. In: BOCK, G.; WHELAN, J. **Novel diarrhea viruses**. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 1987, p.6-23.

BRITO, B.G.; FILLIPSEN, L.F.; MORES, N.; BRENTANO, N.; BRITO, M.A.V.P. Etiologia da diarréia de leitões lactentes em granjas suínícolas do sudoeste do Paraná. **Semina Ciências Agrárias**, v.16, p.13-17, 1995.

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

CAUL, E.O.; ASHLEY, C.R.; DARVILLE, J.M.; BRIDGER, J.C. Group C rotavirus associated with fatal enteritis in a family outbreak. **Journal of Medical Virology**, v.30, p.201-205, 1990.

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

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

COOK, S.M.; GLASS, R.I.; LeBARON, C.W.; MEI-SHANG, H. Global seasonality of rotavirus infectious. **Bulletin of the World Health Organization**, v.68, p.171-177, 1990.

CRAWFORD, S.E.; PATEL, D.G.; CHENG, E.; BERKOVA, Z.; HYSER, J.M.; CIARLET, M.; FINEGOLD, M.J.; CONNER, M.E.; ESTES, M.K. Rotavirus viremia and extra intestinal viral infection in the neonatal rat model. **Journal of Virology**, v.80, p.4820-4832, 2006.

DEWEY, C.E.; WITTUM, T.E.; HURD, H.S.; DARGATZ, D.A.; HILL, G.W. Herd and litter-level factors associated with the incidence of diarrhea morbidity and mortality in piglets 4-14 days of age. **Journal of Swine Health and Production**, v.3, p.21-28, 1995.

ESONA, M.D.; HUMPHREY, C.D.; DENNEHY, P.H.; JIANG, B. Prevalence of group C rotavirus among children in Rhode Island, United States. **Journal of Clinical Virology**, v.42, p.221-224, 2008.

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

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

FITZGERALD, G.R.; BARKER, T.; WELTER, M.W.; WELTER, C.J. Diarrhea in young pigs: comparing the incidence of the five most common infectious agents. **Journal of Veterinary Medicine**, v.38, p.80-86, 1988.

GABBAY, Y.B.; BORGES, A.A.; OLIVEIRA, D.S.; LINHARES, A.C.; BARARDI, R.M.; WANG, Y.; MASCARENHAS, J.D.P.; GLASS, R.I.; JIANG, B. Evidence for zoonotic transmission of group C rotaviruses among children in Belém, Brazil. **Journal of Medical Virology**, v.80, p. 1666-1674, 2008.

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

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

GRICE, A.S.; LAMBDEN, P.R.; CAUL, E.O.; CLARKE, I.N. Sequence conservation of the major outer capsid glycoprotein of human group C rotaviruses. **Journal of Medical Virology**, v.44, p.166–171, 1994.

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.

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

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

JEONG, Y.; PARK, S.; HOSMILLO, M.; SHIN, D.; CHUN, Y.; KIM, H.; KWON, H.; KANG, S.; WOO, S.; PARK, S.; KIM, G.; KANG, M.; CHO, K. Detection and molecular characterization of porcine group C rotaviruses in South Korea. **Veterinary Microbiology**, v.138, p.217-24, 2009.

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.; MPHAAHLELE, 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.

JIANG, B.M.; DENNEHY, P.H.; SPANGENBERGER, S.; GENTSCH, J.R.; GLASS, R.I. First detection of Group C rotavirus in fecal specimens of children with diarrhea in the United States. **Journal of Infectious Diseases**, v.172, p.45–50, 1995.

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

JIANG, B.; GENTSCH, J.R.; TSUNEMITSU, H.; SAIF, L.J.; GLASS, R.I. Sequence analysis of the gene encoding VP4 of a bovine group C rotavirus: molecular evidence for a new P genotype. **Virus Genes**, v.19, p.85-88, 1999.

JIANG, S.; JI, S.; TANG, Q.; CUI, X.; YANG, H.; KAN, B.; GAO, S. Molecular characterization of a novel adult diarrhea rotavirus strain J19 isolated in China and its significance for the evolution and origin of group B rotaviruses. **Journal of General Virology**, v.89, p.2622–2629, 2008.

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

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.

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

KUZUYA, M.; FUJII, R.; HAMANO, M.; YAMADA, M.; SHINOZAKI, K.; SASAGAWA, A.; HASEGAWA, S.; KAWAMOTO, H.; MATSUMOTO, K.; KAWAMOTO, A.; ITAGAKI, A.; FUNATSUMARU, S.; URASAWA, S. Survey of human group C rotaviruses in Japan during the winter of 1992 to 1993. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, p.6–10, 1998.

LEE, S.G.; YOUN, S.H.; OH, M.H.; RHEE, O.J.; OH, S.; PAIK, S.Y. Molecular characterization of two strains of porcine group C rotavirus. **Journal of Microbiology**, v.49, p.1058–1062, 2011.

LINARES, R.C.; BARRY, A.F.; ALFIERI, A.F.; MEDICI, 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.; STIPP, D.T.; POSSATTI, F.; CAMPANHA, J.E.T.; ALFIERI, A.F.; ALFIERI, A.A. Diarrhea outbreaks in suckling piglets due to rotavirus group C single and mixed (rotavirus groups A and B) infections. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 2014 (*in press*).

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

MAGAR, R.; ROBISON, Y.; MORIN, M. Identification of atypical rotaviruses in outbreaks of preweaning and postweaning diarrhea in Quebec swine herds. **Canadian Journal Veterinary Research**, v.55, p.260-263, 1991.

MARTELLA, V.; BANYAI, K.; LORUSSO, E.; BELLACICCO, A.L.; DECARO, N.; CAMERO, M.; BOZZO, G.; MOSCHIDOU, P.; ARISTA, S.; PEZZOTII, G.; LAVAZZA,

A.; BUONAVOGLIA, C. Prevalence of group C rotavirus in weaning and post-weaning pigs with enteritis. **Veterinary Microbiology**, v.123, p.26-33, 2007a.

MARTELLA, V.; BANYAI, K.; LORUSSO, E.; DECARO, N.; BELLACICCO, A.L.; DESARIO, C.; CORRENTE, M.; GRECO, G.; MOSCHIDOU, P.; TEMPESTA, M.; ARISTA, S.; CIARLET, M.; LAVAZZA, A.; BUONAVOGLIA, C. Genetic heterogeneity in the VP7 of group C rotaviruses. **Virology**, v.367, p.358–366, 2007b.

MARTHALER, D.; ROSSOW, K.; CULHANE, M.; COLLINS, J.; GOYAL, S.; CIARLET, M.; MATTHIJNSSENS, J. Identification, phylogenetic analysis and classification of porcine group C rotavirus VP7 sequences from the United States and Canada. **Virology**, v. 446, p189-198, 2013.

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

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

MATTHIJNSSENS, J.; OTTO, P.H.; CIARLET, M.; DESSELBERGER, U.; VAN RANST, M.; JOHNE, R. VP6-sequence-based cutoff values as a criterion for rotavirus species demarcation. **Archives of Virology**, v.157, n.6, p.1177–1182, 2012.

McNULTY, M.S.; ALLAN, G.M.; TODD, D.; McFERRAN, J.B.; McKILLOP, E.R.; COLLINS, D.S.; McCracken, R.M. Isolation of rotaviruses from turkeys and chickens: demonstration of distinct serotypes and RNA electropherotypes. **Avian Pathology**, v.9, p.363–375, 1980.

MÉDICI, K.C.; BARRY, A.; ALFIERI, A.F.; ALFIERI, A.A. VP6 gene diversity in Brazilian strains of porcine group C rotavirus. **Genetics and Molecular Research**, v.9, p.506-513, 2010.

MÉDICI, K.C.; BARRY, A.; ALFIERI, F.A.; 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, p.146-150, 2011.

MORIN, M.; MAGAR, R.; ROBINSON, Y. Porcine group C rotavirus as a cause of neonatal diarrhea in a Quebec swine herd. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.54, p.385–389, 1990.

- MOUTELÍKOVÁ, R.; PRODELALOVÁ, J.; DUFKOVÁ, L. Prevalence study and phylogenetic analysis of group C porcine rotavirus in the Czech Republic revealed a high level of VP6 gene heterogeneity within the porcine cluster I1. **Archives of Virology**, 2013. Disponível em <<http://link.springer.com/article/10.1007/s00705-013-1903-4#page-1>> Acesso em: 13 jan. 2014.
- NAGASHIMA, S.; KOBAYASHI, N.; ISHINO, M.; ALAM, M.M.; AHMED, M.U.; PAUL, S.K.; GANESH, B.; CHAWLA-SARKAR, M.; KRISHNAN, T.; NAIK, T.N.; WANG, Y.H. Whole genomic characterization of a human rotavirus strain B219 belonging to a novel group of the genus Rotavirus. **Journal of Medical Virology**, v.80, p.2023–2033, 2008.
- NAGESHA, H.S.; HUN, C.P.; BRIDGER, J.C.; HOLMES, I.H. Atypical rotavirus in Australian pigs. **Archives of Virology**, v.102, p.91-98, 1981.
- OFFIT, P.A.; BLAVAT, G. Identification of two rotavirus genes determining neutralization specificities. **Journal of Virology**, v.57, p.376-378, 1986.
- OTTO, P.; SCHULZE, P.; HERBST, W. Demonstration of group C rotaviruses in fecal samples of diarrheic dogs in Germany. **Archives of Virology**, v.144, p.2467-2473, 1999.
- OTTO, P.; LIEBLER-TENORIO, E.M.; ELSCHNER, M.; REETZ, J.; LÖHREN, U.; DILLER, R. Detection of rotaviruses and intestinal lesions in broiler chicks from flocks with runting and stunting syndrome (RSS). **Avian Diseases**, v.50, p.411–418, 2006.
- 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.
- 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.
- RAHMAN, M.; BANIK, S.; FARUQUE, A.S.; TANIGUCHI, K.; SACK, D.A.; VAN RANST, M.; AZIM, T. Detection and characterization of human group C rotaviruses in Bangladesh. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, p.4460–4465, 2005.
- RODGER, S.M.; BISHOP, R.F.; HOLMES, I.H. Detection of a rotavirus-like agent associated with diarrhea in an infant. **Journal of Clinical Microbiology**, v.16, p.724-726, 1982.

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

SAIF, L.J. Non group A rotaviruses. In: SAIF, L.J.; THEIL, K.W. (Org.). **Viral diarrheas of man and animals**. Florida: CRC Press, 1989, p.73-96.

SÁNCHEZ-FAUQUIER, A.; ROMAN, E.; COLOMINA, J.; WILHELMI, I.; GLASS, R.I.; JIANG, B. First detection of group C rotavirus in children with acute diarrhea in Spain. **Archives of Virology**, v.148, n.2, p.399–404, 2003

SANEKATA, T.; KUWAMOTO, Y.; AKAMATSU, S.; SAKON, N.; OSETO, M.; TANIGUCHI, K.; NAKATA, S.; ESTES, M.K. Isolation of group B porcine rotavirus in cell culture. **Journal of Clinical Microbiology**, v.34, n.3, p.759-761, 1996.

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.

SZUCS, G.; KENDE, M.; UJ, M. Atypical human rotaviruses in Hungary. **Annales de l'Institut Pasteur / Virologie**, v.138, p.391–395, 1987.

TAGLIARI, K.C.; BRITO, B.G. Reduction of weight gain and mortality caused by diarrhea in suckling piglets. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, v.4, n.2, p.211-213, 1998.

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

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

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

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

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

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

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

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

YUAN, L.; STEVENSON, G.W.; SAIF, L.J. Rotavirus and Reovirus. In: STRAW, B.E.; ZIMMERMAM, J.J.; D'ALLAIRE, S.; TAYLOR, D.J. **Diseases of Swine**. 9. ed. Iowa: Blacbell Publishing, 2006, p.435-454.

2. OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL:

- Determinar a diversidade genética de cepas de rotavírus C suíno identificadas em rebanhos brasileiros.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Ratificar a presença de RVC por meio de RT-PCR em amostras selecionadas a partir de uma coleção de fezes diarreicas obtidas de leitões provenientes de distintas regiões geográficas brasileiras, previamente positivas na PAGE;
- Amplificar e sequenciar produtos dos genes VP6 (1353 pb), VP7 (1043 pb) e VP4 (800 pb) de cepas de RVC previamente selecionadas;
- Realizar análises filogenéticas para a definição dos genótipos I (VP6), G (VP7) e P (VP4) em cepas brasileiras de RVC;
- Realizar análises comparativas dos genótipos identificados nas cepas brasileiras de RVC suíno com aquelas de origem suína, bovina e humana disponíveis em bases públicas de dados (*GenBank*).

3 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

3.1 GENETIC HETEROGENEITY OF PORCINE ROTAVIRUS C IDENTIFIED IN BRAZILIAN FIELD STRAINS AND EVIDENCE OF A PUTATIVE NEW P-GENOTYPE

Abstract: Porcine rotavirus C (RVC) is an important cause of enteritis, mainly in nursing piglets, and a high incidence of this infection has been demonstrated in Brazilian pig herds. To investigate the genetic diversity of porcine RVC in herds from six states from three major Brazilian pig-producing regions, the VP6, VP7, and VP4 genes of 15 RVC-positive diarrheic fecal samples were amplified, sequenced, and the phylogeny was analyzed in comparison with other RVC sequences available in public databases. The VP6 gene analysis demonstrated a considerable heterogeneity between the 15 RVC samples, that showed 83.2 to 100% of nucleotide (nt) identity to each other and 82.6 to 98% nt identity to other porcine RVC strains. In the phylogenetic tree the Brazilian porcine RVC field strains clustered in two distinct lineages (Porcine I and Porcine II), of the porcine genotype I1. Analysis of the VP7 gene, revealed that most samples ($n = 14$) were G6 genotype and shared high nt identity with each other (88.2-100%). However, the RVC sample BRA57/11 were not closely related (74.5-76.7% nt identity) with the other samples, and clustered with the prototype Cowden strain, which represent the G1 genotype. In the VP4 gene analysis the 15 RVC samples demonstrated a high genetic heterogeneity, with 60.7 to 100% nt identity with each other. Based on a cutoff value of 80%, three porcine genotypes can be described besides of Cowden P[1]. We suggest to nominate the previous identified South Korean strains (CUK-5 and CUK-6) as P[4] genotype and the recently described North American RV0143/11 strain as P[5] genotype. In the phylogenetic tree the Brazilian sample BRA77/11 grouped in the same branch of P[4] CUK-5 and CUK-6 strains. The sample BRA57/11 grouped in the same branch of Cowden strain, but shared less than 80% of nt identity (74.4%), representing a possible new genotype, tentatively named P[6]. The others 13 samples grouped together with RV0143/11 strain, with a nt similarity of 83.3 to 87.3%, indicating that most of porcine RVC strains from this study were from the putative P[5] genotype. The results show the occurrence of the wide diversities in VP6, VP7, and VP4 genes in porcine RVC Brazilian field strains, including the description of a potential new VP4 genotype. This study contributes with molecular information to establishment of a formal classification system and to obtain information on ecology and evolution of the RVC strains circulating throughout the world.

Keywords: Piglets. Diarrhea. RVC. Genotypes

Introduction

Rotavirus (RV) is one of the most important pathogens that cause neonatal diarrhea in piglets worldwide. The RV belong to *Reoviridae* family, and their genome consists of 11 segments of double-stranded RNA (dsRNA) surrounded by a triple-layered capsid (ESTES; KAPIKIAN, 2007). The outer capsid is composed by

the proteins VP4 and VP7, which induces neutralizing antibodies. The middle layer of viral capsid is formed by the structural protein VP6. Based on the antigenic properties and sequence diversity of the VP6, RV is classified into eight species or groups (A-H) (ESTES; KAPIKIAN 2007; MATTHIJNSSENS et al., 2012).

The rotavirus C (RVC) was first detected in the USA from a piglet with diarrhea in 1980. The new identified strain was inoculated in gnotobiotic piglets, which showed diarrhea and intestinal lesions (SAIF et al., 1980). Seroepidemiological studies demonstrated that porcine RVC is widespread in pig herds worldwide (BRIDGER; BROWN, 1985; BRIDGER, 1987; TERRET et al., 1987; SAIF, 1989; TSUNEMITSU; JIANG; SAIF, 1992) and the seroprevalence range from 59-86% in young piglets, increasing with age, reaching to 100% in adult pigs (TERRET et al., 1987).

The porcine RVC dsRNA has been detected worldwide in fecal samples from pigs of all ages, either in single as in mixed infection with other enteric pathogens (ALFIERI et al., 1999a; KIM et al., 1999; MARTELLA et al., 2007a; COLLINS; MARTELLA; O'SHEA, 2008; JEONG et al., 2009; MÉDICI et al., 2010; LEE et al., 2011; MÉDICI et al., 2011; AMIMO; VLASOVA; SAIF, 2013; MARTHALER et al., 2013; MOUTELÍKOVÁ; PRODELALOVÁ; DUFKOVÁ, 2013; LORENZETTI et al., 2014).

RVC transmission interspecies has been described, as a porcine-like RVC strain (WD534tc) in cattle (CHANG et al., 1999) and a bovine-like RVC strain (06-48-2) in pig (JEONG et al., 2009). Besides, porcine-like RVC strain was also detected from Brazilian children, providing evidence of the zoonotic potential of the porcine RVC (GABBAY et al., 2008).

The RVC VP6 gene has been classified into three genotypes (I1-I3) (YAMAMOTO et al., 2011). The I1 genotype is formed by the porcine strains that display genetic diversity in the VP6 gene sequences (MARTELLA et al., 2007a; JEONG et al., 2009; MÉDICI et al., 2010; LEE et al., 2011; AMIMO; VLASOVA; SAIF, 2013; MOUTELÍKOVÁ; PRODELALOVÁ; DUFKOVÁ, 2013). The human and bovine strains belong to genotypes I2 and I3, respectively. Molecular analysis of human RVC VP6 gene suggests that these sequences are conserved (GRICE et al., 1994; JIANG et al., 1996; RAHMAN et al., 2005).

Recently, based on pairwise identity and phylogenetic analysis of the RVC VP7 gene, Marthaler et al. (2013) proposed an 85% nucleotide (nt) identity as a

cutoff value for genotyping classification. Thereby, to date, nine VP7 RVC genotypes (G1-G9) were identified. The bovine and human strains belong to G2 and G4 genotypes, respectively, while RVC porcine strains demonstrated a higher heterogeneity and were classified in seven genotypes (G1, G3, and G5-G9).

A formal classification system of the RVC VP4 gene has not yet been established because of the lack of sequences available in public databases. However, based on the criteria established for rotavirus A (RVA) (MATTHIJNSSENS et al., 2008) and genetic analysis of RVC VP4 gene, three distinct P genotypes has been identified for some researchers and all human RVC strains were assigned to the P[2] genotype, while the porcine (Cowden strain) and bovine (Shintoku strain) prototypes were assigned to P[1] and P[3] genotypes, respectively (JIANG et al., 1999; YAMAMOTO et al., 2011). A previous survey performed in South Korea detected two porcine origin strains (CUK-5 and CUK-6) that grouped in a monophyletic branch, distinct from Cowden strain, the only porcine sequence available to date of the study (LEE et al., 2011). Additionally, a porcine origin strain (RV0143/11) recently detected in the USA represents a new P genotype proposed by Amimo, Vlasova and Saif (2013). Then, up to now, only four porcine RVC VP4 gene sequences (Cowden, CUK-5, CUK-6, and RV0143/11) are available in public databases.

In Brazil, a previous study showed a high incidence of porcine RVC infection and demonstrated that this virus is endemic and widespread in Brazilian pig herds (MÉDICI et al., 2011; LORENZETTI et al., 2014). However, as well as around the world, few molecular characterization studies of porcine RVC were conducted in this country (ALFIERI et al., 1999b; MÉDICI et al., 2010). Thus, in the present study, fecal samples from piglets with diarrhea, from the three major Brazilian pig-producing regions, were analyzed to obtain information on genetic diversity of field Brazilian porcine RVC strains.

Materials and methods

Stool samples and selection criteria

The samples were selected from a collection of fecal samples from all Brazilian geographic regions, which were stored in aliquots at -80°C. The

sampling from this study consisted of 99 diarrheic feces of piglets with 1 to 2-week-old, collected between 2011 and 2013 in 13 pig herds, from six Brazilian states (Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Minas Gerais, and Mato Grosso do Sul) and three geographic regions (South, Southeast, and Midwest). All fecal samples were previously screened for dsRNA presence by silver stained-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) technique carried out according Herring et al. (1982) and Pereira et al. (1983). Thirty seven fecal samples were determined as porcine RVC PAGE-positives and were submitted to partial VP6 gene amplification according Alfieri et al. (1999b), to confirm the dsRNA viability. Of these, 26 porcine RVC RT-PCR-positive fecal samples were selected for molecular analysis. Thus, their complete VP6, nearly-full VP7, and partial VP4 genes were amplified and sequenced. When the samples failed in amplify products with high intensity bands or not generated sequences with quality enough for simultaneous analysis of the three genes, they were excluded.

RNA extraction

The dsRNA extraction was performed from aliquots of 500 μ L of fecal suspensions prepared at 10-20% (w/v) in TRIS/Ca⁺⁺ buffer (50 mM Tris-HCl; 10 mM NaCl; 1.5 mM 2-mercaptoetanol; 3 mM CaCl₂; pH 7.2), using a combination of phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1) (SAMBROOK; RUSSEL, 2001) and silica/guanidinium isothiocyanate (BOOM et al., 1990) nucleic acid extraction methods with modifications, as described by Alfieri et al. (2006). The dsRNA was eluted in diethyl pyrocarbonate (DEPC) treated water (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and kept at -80°C until use. Aliquots of TRIS/Ca⁺⁺ buffer were included as negative control in each extraction and RT-PCR procedure.

RT-PCR

The RT-PCR assays were performed to amplify the specific VP6, VP7, and VP4 porcine RVC genes of the 26 selected diarrheic fecal samples. For the complete VP6 gene amplification were used the BMJ41 forward primer as described by Alfieri et al. (1999b) with addition of three nt in the 3' end position (5' GGC TTT AAA AAT CTC ATT CAC **AA** 3', [nt] 1-23) and a reverse primer (5' AGC CAC ATA

GTT CAC ATT TCA 3' [nt] 1333-1353) as described by Bányai et al. (2006). For partial VP4, and nearly-full VP7 genes amplification were used the primers sets as described by Lee et al. (2011) and Rahman et al. (2005), respectively. In the RT procedure, the samples were incubated at 42°C for 30 min. The following PCR cycling profile was used for the three genes amplification: an initial denaturation step of 5 min at 94°C, followed by 35 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 55°C, and 2 min at 72°C, and a final extension step of 7 min at 72°C.

The products of VP6 (1,353 bp), VP7 (1,043 bp), and VP4 (800 bp) genes amplification were analyzed by electrophoresis in 1-2% agarose gel in TBE buffer (89 mM TRIS; 89 mM boric acid; 2 mM EDTA; pH 8.4), stained with ethidium bromide (0.5 µg/mL), and visualized under UV light.

Sequencing and phylogenetic analysis

The amplicons were purified by PureLink® Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), quantified in a Qubit™ Fluorometer, using QuantiT™ dsDNA BR Assay Kit (Invitrogen, Eugene, OR, USA). An ABI 3500 Genetic Analyzer and the BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) were used for sequencing, which was performed in both directions with forward and reverse primers.

The obtained sequences were analyzed by Phred (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>) and sequences were accepted if base quality were ≥ 20 . The consensus sequences were determined by CAP3 software (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>) and similarity searches were verified with all sequences deposited in GenBank using the BLAST software (Basic Local Alignment Search Tool – <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). For each gene (VP6, VP7 and VP4) a multiple and pairwise alignments were accomplished in MEGA software (v. 6.05) and the identity matrix was performed using the BioEdit software (v. 7.2.5). Phylogenetic trees were obtained by Neighbor-joining method with the model Kimura two-parameter using MEGA software (v. 6.05). Bootstrap values were determined for 1,000 replicates.

Results

Based on the inclusion criteria adopted in this study, 15 samples had sequences with suitable quality scores for phylogenetic analysis of the VP6, VP7, and VP4 genes. The fecal samples were from 13 distinct pig herds, except for the samples BRA154/12 and BRA241/12 that belong to herd 6, and the samples BRA1289/12 and BRA1292/12, which were from herd 7 (Table 1).

The multiple and pairwise alignment of the VP6 gene of 25 sequences of porcine, bovine, and human RVC strains available in GenBank and the 15 RVC samples from this study resulted in a fragment with 1,167 bp. In the molecular analysis our 15 samples of porcine RVC showed 83.2 to 100% of nt identity to each other and 82.6 to 98% nt identity to another porcine RVC strains. In the phylogenetic reconstruction all wild-type porcine RVC Brazilian field strains grouped in the porcine cluster I1 and clearly separated from human (I2) and bovine (I3) clusters (Figure 1A). Within the cluster I1 the 15 samples grouped in three different branches. The porcine RVC fecal samples from Paraná (BRA154/12, BRA241/12, BRA458/12, BRA1289/12, and BRA1292/12) and Rio Grande do Sul (BRA369/12 and BRA580/13) states grouped in the same branch of the previously described Brazilian strain BRA905/07 with the nt similarity ranging from 96.5 to 98%. The samples BRA57/11 and BRA77/11, from Santa Catarina and Mato Grosso do Sul, respectively grouped in the same branch of the Brazilian strains BRA258/04, BRA634/05 and the Korean strain CA-2. Six samples from Santa Catarina (BRA217/12, BRA554/13, BRA573/13, and BRA1436/13), São Paulo (BRA576/13), and Minas Gerais (BRA541/13) showed the highest nt similarity (91.6-95.5%) with the BRA1034/10 strain and grouped in the same branch.

The molecular analysis of the VP7 gene indicated that the sample BRA57/11 showed higher nt identity with the porcine RVC prototype strain Cowden (89.4%) than another samples from this study (74.5-76.7%). In the phylogenetic tree the other 14 samples clustered together with the North American and Italian porcine RVC strains, in a cluster clearly separated from the BRA57/11 and Cowden strains (Figure 1B), and demonstrated high nt similarity with each other (88.2 to 100%).

In the partial VP4 gene sequences analysis, the nt identity between the porcine RVC samples included in this study ranged from 60.7 to 100%, which revealed a high genetic heterogeneity in porcine RVC Brazilian field strains. In the

phylogenetic tree most of samples grouped with the RV0143/11 strain, that represent the new VP4 genotype recently proposed (AMIMO; VLASOVA; SAIF, 2013). The sample BRA77/11 grouped with the South Korean strains. Although the Brazilian porcine RVC sample BRA57/11 grouped in the same branch of the Cowden strain, they were distantly related to one another (74.4% nt identity) (Figure 1C).

Discussion

Porcine RVC has been considered an important cause of enteritis, mainly in nursing piglets around the world (SAIF; JIANG, 1994; KIM et al., 1999; MÉDICI et al., 2011; AMIMO; VLASOVA; SAIF, 2013; MARTHALER et al., 2013; LORENZETTI et al., 2014). Furthermore, in very young pigs, the porcine RVC associated with diarrhea occurred more as a single agent than in association with porcine RVA and/or porcine rotavirus B (RVB) (AMIMO; VLASOVA; SAIF, 2013; MARTHALER et al., 2013; LORENZETTI et al., 2014).

In this study, were analyzed the VP6, VP7, and VP4 genes of porcine RVC identified in diarrheic fecal samples from piglets aged 1 to 2-week-old obtained from 13 pig herds from six Brazilian states in 3 geographic regions.

Since a formal classification system for VP6 and VP4 genes of RVC has not yet been established because of the lack of sequences available in public databases, the genotype nomenclatures used for RVA (MATTHIJNSSENS et al., 2008) has been provisionally assigned. On the other hand, genotyping classification for the VP7 gene has been recently proposed by Marthaler et al. (2013). Based on the pairwise identity frequency graphs and phylogenetic analysis, nine G genotypes were adopted.

The VP6 gene analysis from the porcine RVC samples identified in this study demonstrated genetic heterogeneity between them. Similar results were detected in previous studies conducted in Brazil, Italy, South Korea, and North America (MARTELLA et al., 2007a; JEONG et al., 2009; MÉDICI et al., 2010; LEE et al., 2011; AMIMO; VLASOVA; SAIF, 2013).

In the phylogenetic analysis, the Brazilian RVC porcine samples grouped in the porcine cluster I1, but in two different lineages (Porcine I and Porcine II), which is consistent with the results reported for Médici et al. (2010) and Moutelíková, Prodelalová and Dufková (2013). The samples from Santa Catarina

state (BRA217/12, BRA554/13, BRA573/13, and BRA1436/13), besides the samples BRA 541/13 and BRA576/13, from Minas Gerais and São Paulo, respectively, were grouped in the same lineage that the prototype Cowden, the Porcine I. However, all RVC samples from Paraná (BRA154/12, BRA241/12, BRA458/12, BRA1289/12, and BRA1292/12) and Rio Grande do Sul (BRA369/12 and BRA580/13) states were grouped in the Porcine II lineage. Although the BRA57/11 (from Santa Catarina state) and BRA77/11 (from Mato Grosso do Sul state) samples were grouped in a distinct branch of the samples from Paraná and Rio Grande do Sul states, they clustered in the same Porcine II lineage. Within each branch, the porcine RVC samples from this study showed the highest nt similarity with other Brazilian strains (91.6-95.5% for BRA1034/10; 91.1-91.6% for BRA258/04 and BRA 634/05; 96.5-98% for BRA905/07), from Minas Gerais, Rio Grande do Sul, Paraná, and Santa Catarina states, previously identified in the years 2004 to 2010 (STIPP et al., unpublished dates). These results suggest that in Brazil the same strains have spread over the years, without a characteristic pattern on geographical distribution of the lineages.

Analysis of the VP7 gene sequences of the 15 porcine Brazilian RVC samples showed that most of them ($n=14$) shared high nt identity with each other (88.2-100%). Only the sample BRA57/11 was not closely related with the other samples (74.5-76.7% nt identity). The BRA57/11 was most closely related (89.4% nt identity) with Cowden strain and grouped in the same cluster of the porcine RVC G1 strains in the phylogenetic tree. The other 14 samples grouped with North American and Italian strains in the G6 genotype cluster. These results are in accordance with Marthaler et al. (2013), who showed that the G6 were the most common porcine RVC VP7 genotype detected in USA and Canada.

Based on the VP4 gene typing scheme suggested by Jiang et al. (1999), all human and bovine RVC strains were assigned as P[2] and P[3] genotypes, respectively, and the porcine prototype Cowden strain was assigned as P[1] genotype. The porcine RVC strains previously identified in South Korea (CUK-5 and CUK-6) shared the higher nt identity with Cowden (70.1-71.7%), but the both strains grouped in a monophyletic branch, distinct from porcine prototype strain (LEE et al., 2011). In addition, a potential new VP4 genotype strain (RV0143/11) was recently described in the USA (AMIMO; VLASOVA; SAIF, 2013). In the phylogenetic reconstruction, the Brazilian porcine RVC field strain BRA57/11, as well as occurred for the VP7 gene analysis, grouped with Cowden strain. However, the VP4 nt

sequence similarity between BRA57/11 and Cowden (74.4%) strains were less than the cutoff value of $\geq 80\%$ determined for RVA classification in the same P-genotype (MATTHIJNSSENS et al., 2008). These results evidence the existence of three potential new porcine genotypes beyond the Cowden P[1]. We suggest assigning the Korean strains as P[4] genotype, the American RV0143/11 strain as putative P[5] genotype, and the BRA57/11 as representant of putative P[6] genotype, following what has been previously proposed by Jiang et al. (1999). Thus, six P genotypes can be observed in the phylogenetic tree (P[1]-[6]).

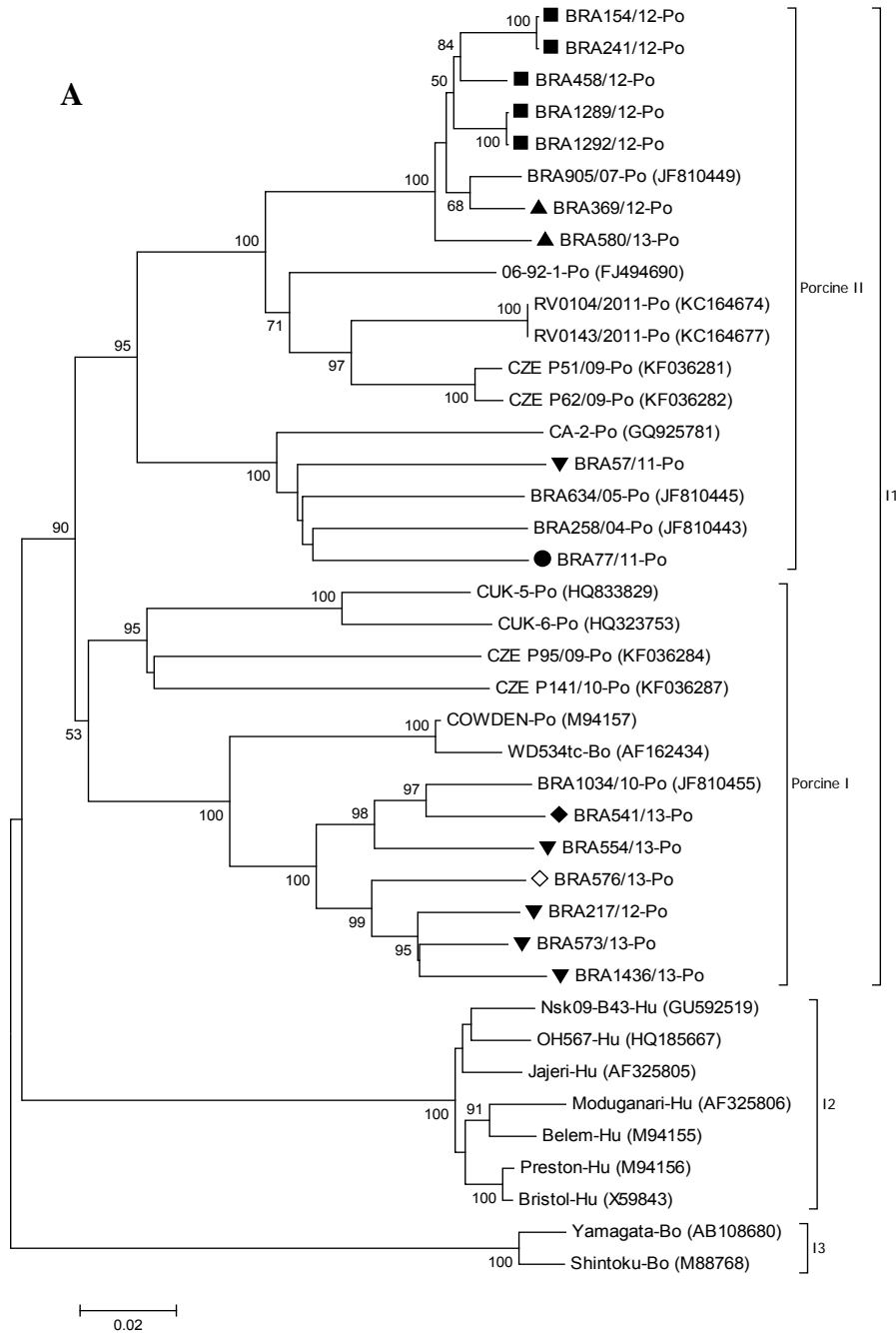
Similar with the porcine RVA, the most genetic distance found in this study was in the VP4 gene sequences. The nt identity of the Brazilian porcine RVC samples ranged from 60.7 to 100% and they grouped in three different clusters. Most of the RVC samples from this study clustered with the RV0143/11 strain, a P[5] genotype, with nt similarity ranging from 83.3 to 87.3%. The sample BRA77/11 grouped with the P[4] genotype South Korean strains (CUK-5 and CUK-6) showing 81.5% and 83% of nt identity, respectively.

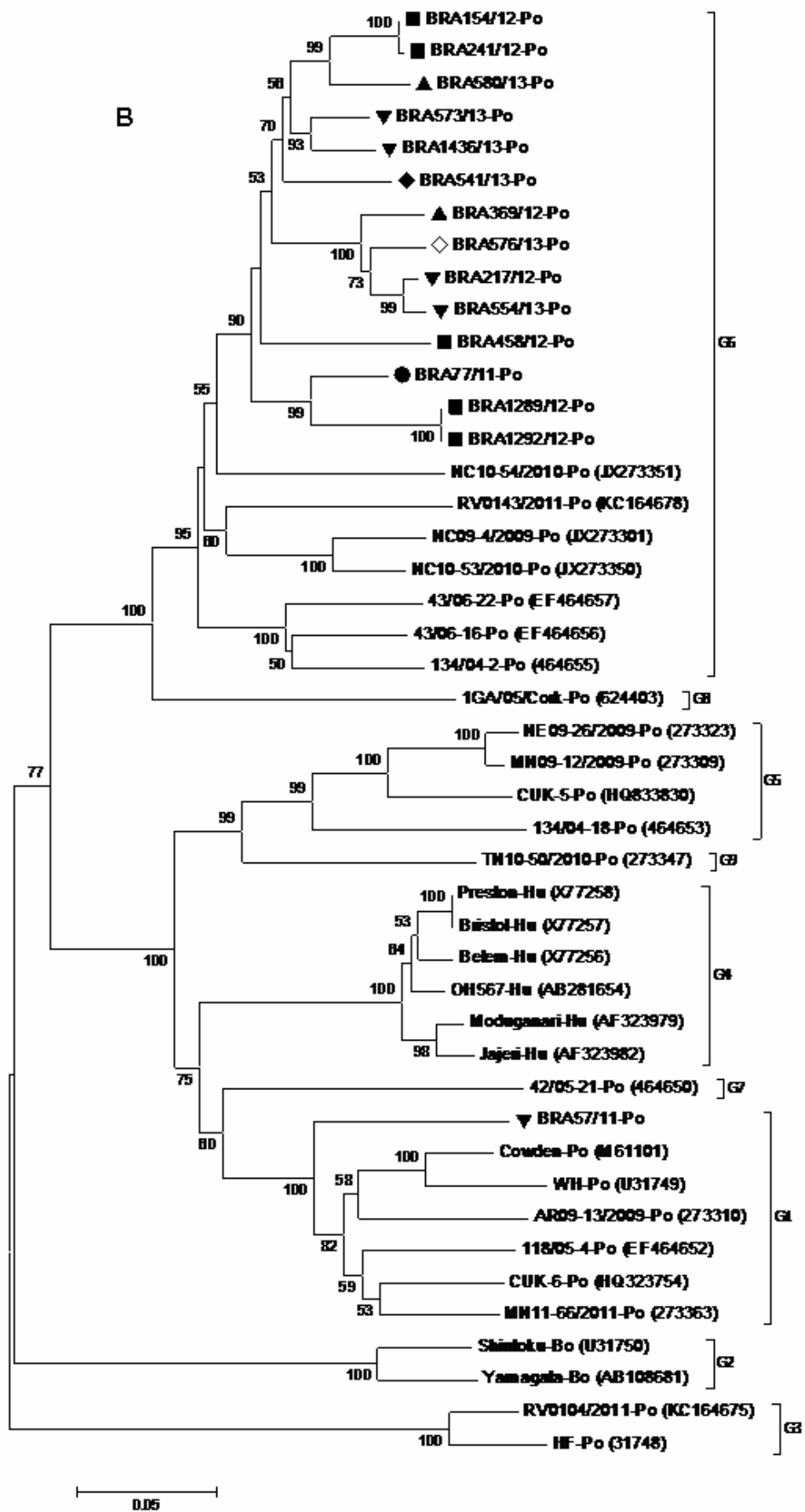
Additionally, for the three genes analyzed, the 15 Brazilian porcine RVC samples grouped in clusters distinctly separated from those formed by human and bovine origin RVC strains, with lower nt similarity (81-83.2% for VP6; 74.8-82.1% for VP7; 59.3-67.1% for VP4) than with porcine strains.

The samples BRA154/12 and BRA241/12, that were from the same pig herd (herd 6) were most closely related with each other and showed 100% of nt identity for the three genes analyzed. The other two samples BRA1289/12 and BRA1292/12, which were from the same pig herd too (herd 7), showed 100% of nt identity for VP6 and VP4 gene, while in the VP7 they showed 99.7%. It suggests that these specimens from each herd represent the same local porcine RVC strain.

In conclusion, this study provides evidence that the porcine RVC strains detected during 2011 to 2013 in different Brazilian pig herds display a high genetic heterogeneity in the genes encoding both VP4 as VP7 and VP6. Further molecular studies may be needed in order to confirm the new potential VP4 genotype found in this study, besides to establish a formal classification system and to obtain information on ecology and evolution from RVC strains circulating throughout the world.

Figure 1 – Neighbor-joining trees based on the nucleotide sequences of RVC VP6 (A), VP7 (B), and VP4 (C) genes from porcine rotavirus C samples described in this study and another strains acquired from GenBank. The shape markers of porcine RVC strains detected in this study are in accordance to the pig herd location (MG [◆], MS [●], PR [■], RS [▲], SC [▼], SP [◇]). The numbers adjacent to the nodes represent the percentage of bootstrap support (of 1,000 replicates) for the clusters to the right of node. Bootstrap values lower than 50% are not shown. Bo: bovine; Hu: human; Po: porcine.





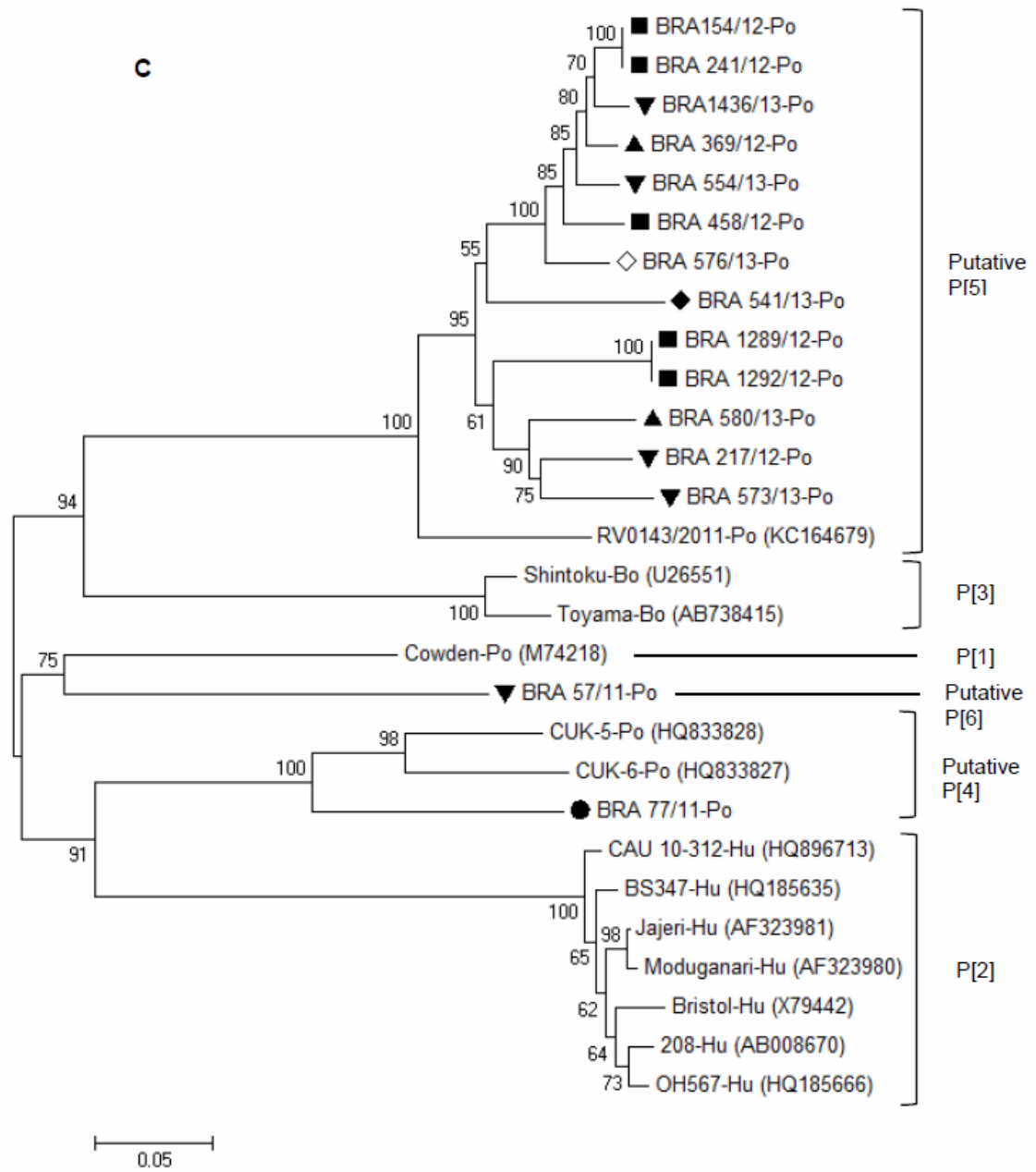


Table 1 – Brazilian porcine RVC wild-type strains with VP6, VP7, and VP4 genes sequences performed in this study, their geographical region, state and herd of origin.

Geographical region	State	Herd	Sample
South	Rio Grande do Sul	4	BRA369/12
		12	BRA580/13
	Santa Catarina	1	BRA57/11
		3	BRA217/12
		9	BRA554/13
		10	BRA573/13
		13	BRA1436/13
		5	BRA458/12
	Paraná	6	BRA154/12
			BRA241/12
		7	BRA1289/12
			BRA1292/12
	Southeast	São Paulo	11
Minas Gerais		8	BRA541/13
Midwest	Mato Grosso do Sul	2	BRA77/11

REFERENCES

- ALFIERI, A.A.; ALFIERI, A.F.; BEUTTEMULLER, E.A.; BRITO, B.G.; MEDICI, K.C. Aspectos epidemiológicos da rotavirose suína na região sudoeste do estado do Paraná. **Semina Ciências Agrárias**, v.20, n.1, p.5-11, 1999a.
- ALFIERI, A.A.; LEITE, J.P.G.; ALFIERI, A.F.; JIANG, B.; GLASS, R.I.; GENTSCH, J.R. Detection of field isolates of human and animal group C rotavirus by reverse transcription-polymerase chain reaction and digoxigenin-labeled oligonucleotide probes. **Journal of Virological Methods**, v.83, p.35-43, 1999b.
- ALFIERI, A.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.
- AMIMO, J.O.; VLASOVA, A.N.; SAIF, L.J. Prevalence and genetic heterogeneity of porcine group C rotaviruses in nursing and weaned piglets in Ohio, USA and identification of a potencial new VP4 genotype. **Veterinary Microbiology**, v. 164, p.27-38, 2013.
- BÁNYAI, K.; JIANG, B.; BOGDÁN, A.; HORVÁTH, B.; JAKAB, F.; MELEG, E.; MARTELLA, V.; MAGYARI, L.; MELEGH, B.; SZUCS, G. Prevalence and molecular characterization of human group C rotaviruses in Hungary. **Journal of Clinical Virology**, v.37, p.317-322, 2006.
- BOOM, R.; SOL, C.J.; SALIMANS, M.M.; JANSEN, C.L.; WERTHEIM-VAN DILLEN, P.M.; VAN DER NOORDAA, J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v.28, p.495-503, 1990.
- BRIDGER, J.C.; BROWN, J.F. Prevalence of antibody to typical and atypical rotaviruses in pigs. **Veterinary Record**, v.116, n.2, p.50, 1985.
- BRIDGER, J.C. Novel rotaviruses in animals and man. In: BOCK, G.; WHELAN, J. **Novel diarrhea viruses**. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 1987, p.6-23.
- CHANG, K.O.; NIELSEN, P.R.; WARD, L.A.; SAIF, L.J. Dual infection of gnotobiotic calves with bovine strains of group A and porcine-like group C rotaviruses influences pathogenesis of the group C rotavirus. **Journal of Virology**, v.73, p.9284-9293, 1999.
- COLLINS, P.J.; MARTELLA, M.; O'SHEA, H. Detection and characterization of group C rotaviruses in asymptomatic piglets in Ireland. **Journal of Clinical Microbiology**, v.46, p.2973-2979, 2008.
- ESTES, M.K.; KAPIKIAN, A.Z. Rotaviruses. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (Ed.) **Fields Virology**. 5 th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p.1917-1974, 2007.
- GABBAY, Y.B.; BORGES, A.A.; OLIVEIRA, D.S.; LINHARES, A.C.; BARARDI, R.M.; WANG, Y.; MASCARENHAS, J.D.P.; GLASS, R.I.; JIANG, B. Evidence for zoonotic

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

GRICE, A.S.; LAMBDEN, P.R.; CAUL, E.O.; CLARKE, I.N. Sequence conservation of the major outer capsid glycoprotein of human group C rotaviruses. **Journal of Medical Virology**, v.44, p.166–171, 1994.

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

JEONG, Y.; PARK, S.; HOSMILLO, M.; SHIN, D.; CHUN, Y.; KIM, H.; KWON, H.; KANG, S.; WOO, S.; PARK, S.; KIM, G.; KANG, M.; CHO, K. Detection and molecular characterization of porcine group C rotaviruses in South Korea. **Veterinary Microbiology**, v.138, p.217-24, 2009.

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

JIANG, B.; GENTSCH, J.R.; TSUNEMITSU, H.; SAIF, L.J.; GLASS, R.I. Sequence analysis of the gene encoding VP4 of a bovine group C rotavirus: molecular evidence for a new P genotype. **Virus Genes**, v.19, p.85-88, 1999.

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

LEE, S.G.; YOUN, S.H.; OH, M.H.; RHEE, O.J.; OH, S.; PAIK, S.Y. Molecular characterization of two strains of porcine group C rotavirus. **Journal of Microbiology**, v.49, p.1058–1062, 2011.

LORENZETTI, E.; STIPP, D.T.; POSSATTI, F.; CAMPANHA, J.E.T.; ALFIERI, A.F.; ALFIERI, A.A. Diarrhea outbreaks in suckling piglets due to rotavirus group C single and mixed (rotavirus groups A and B) infections. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 2014 (*in press*).

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

MARTHALER, D.; ROSSOW, K.; CULHANE, M.; COLLINS, J.; GOYAL, S.; CIARLET, M.; MATTHIJNSSENS, J. Identification, phylogenetic analysis and classification of porcine group C rotavirus VP7 sequences from the United States and Canada. **Virology**, v. 446, p189-198, 2013.

MATTHIJNSSENS, J.; CIARLET, M.; HEIMAN, E.; ARIJS, I.; DELBEKE, T.; MCDONALD, S.M.; PALOMBO, E.A.; ITURRIZA-GOMARA, M.; MAES, P.; PATTON, J.T.; RAHMAN, M.; VAN RANST, M. Full genome-based classification of rotaviruses

reveals a common origin between human Wa-like and porcine rotavirus strains and human DS-1-like and bovine rotavirus strains. **Journal of Virology**, v.82, n.7, p.3204-3219, 2008.

MATTHIJNSSENS, J.; OTTO, P.H.; CIARLET, M.; DESSELBERGER, U.; VAN RANST, M.; JOHNE, R. VP6-sequence-based cutoff values as a criterion for rotavirus species demarcation. **Archives of Virology**, v.157, n.6, p.1177–1182, 2012.

MÉDICI, K.C.; BARRY, A.F.; ALFIERI, A.F.; ALFIERI, A.A. VP6 gene diversity in Brazilian strains of porcine group C rotavirus. **Genetics and Molecular Research**, v.9, p.506-513, 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, p.146-150, 2011.

MOUTELÍKOVÁ, R.; PRODELALOVÁ, J.; DUFKOVÁ, L. Prevalence study and phylogenetic analysis of group C porcine rotavirus in the Czech Republic revealed a high level of VP6 gene heterogeneity within the porcine cluster I1. **Archives of Virology**, 2013. Disponível em <<http://link.springer.com/article/10.1007/s00705-013-1903-4#page-1>> Acesso em: 13 jan. 2014.

PEREIRA, H.G., AZEREDO, R.S., LEITE, J.P., BARTH, O.M., SUTMOLLER, F., DE FARIAS, V.; VIDAL, M.N. Comparison of polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), immuno-electron microscopy (IEM) and enzyme immunoassay (EIA) for the rapid diagnosis of rotavirus infection in children. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.78, p.483–490, 1983.

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

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

SAIF, L.J. Non group A rotaviruses. In: SAIF, L.J.; THEIL, K.W. (Org.). **Viral diarrheas of man and animals**. Florida: CRC Press, 1989, p.73-96.

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

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular Cloning: a Laboratory Manual**. 3rd. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

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

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

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

CONCLUSÕES

- Este estudo demonstrou grande variabilidade genética nos genes VP6, VP7 e VP4 em cepas de RVC provenientes de rebanhos suínos de diferentes regiões geográficas brasileiras;
- Na análise filogenética do gene VP6, todos os isolados de RVC deste estudo agruparam com as cepas suínas classificadas como genotipo I1, porém em duas linhagens distintas denominadas *Porcine I* e *Porcine II*;
- Foram identificados dois genótipos do gene VP7, G1 e G6, sendo que a maioria das amostras avaliadas pertence ao genótipo G6;
- A análise do gene VP4 possibilitou agrupar as amostras brasileiras de RVC em três *clusters* distintos que foram provisoriamente denominados como genótipos P[4], P[5] e P[6];
- A maioria das amostras de RVC identificadas neste estudo pertence ao genótipo P[5];
- A caracterização de uma cepa de RVC demonstrando baixa identidade de nt com as demais cepas já descritas do gene VP4 evidencia a identificação de um novo P-genótipo.

ANEXOS

ANEXO A
Lista de reagentes

1. Acetona, P.A. (CH_3COCH_3) P.M. 58,08 (Dinâmica[®])
2. Ácido bórico (H_3BO_3) P.M. 61,83 (Sicalab[®])
3. Ácido clorídrico (HCl) P.M. 36,46 (Reagen[®])
4. Ácido etilenodiaminotetraácido sal di-sódico – EDTA, P.A. ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2\text{H}_2\text{O}$) P.M. 372,24 (Reagen[®])
5. Agarose (Invitrogen[™] Life Technologies)
6. Água DEPC (Dietil pirocarbonato) (Invitrogen Life Technologies[®])
7. Álcool etílico absoluto ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) P.M. 46,07 (Nuclear[®])
8. Álcool isoamílico ($(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$) P.M. 88,15 (Synth[®])
9. Azul de bromofenol (Sigma[®])
10. Bicarbonato de sódio P.A. (NaHCO_3) P.M. 84,01 (Biotec[®])
11. Brometo de etídio ($\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{Br}$) P.M. 394,3 (Sigma[®])
12. Cloreto de cálcio puro (CaCl_2) P.M. 110,94 (Invitrogen[™] Life Technologies)
13. Cloreto de magnésio 50 mM (MgCl_2) (Invitrogen Life Technologies[®])
14. Cloreto de potássio, P.A. (KCl) P.M. 74,56 (Reagen[®])
15. Cloreto de sódio, P.A. (NaCl) P.M. 58,45 (Reagen[®])
16. Clorofórmio, P.A. (CHCl_3) P.M. 119,38 (Dinâmica[®])
17. Dióxido de sílica (SiO_2) P.M. 60,08 (Sigma[®])
18. DNA Ladder (123 bp) (Invitrogen Life Technologies[™])
19. dNTP Set (100 mM), 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[™])
20. Dodecil sulfato de sódio – Lauril Sulfato de Sódio – SDS ($\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_4\text{S}$) P.M. 288,38 (Synth[®])
21. Fenol ($\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$) P.M. 94,11 (Invitrogen Life Technologies[™])
22. Fosfato de sódio dihidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) P.M. 177,99 (Merck[®])
23. Fosfato de sódio monobásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) P.M. 155,99 (Reagen[®])
24. Fosfato de sódio dibásico anidro (Na_2HPO_4) P.M. 141,96 (Synth[®])
25. Glicose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) P.M. 180,16 (Reagen[®])
26. Hidróxido de sódio, P.A. (NaOH) P.M. 40,00 (Dinâmica[®])
27. Hidroximetil amino metano – TRIS 99% P.M. 121,14 (Inlab[®])
28. Isotiocianato de guanidina P.M. 118,16 (Gibco BRL[®])

29. Metanol P.A. (CH₃OH) P.M. 32,04 (Allkimia[®])
30. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) BMJ41 (forward; 5'-GGCTTTAAAATCTCATTCA - 3', [nt] 1-20); Alfieri et al. (1999b) - 200 pmol (Invitrogen Life Technologies[®])
31. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) BMJ42 (reverse; 5'-CCTCTAGTTGATTGAACATA- 3', [nt] 251-270); Alfieri et al. (1999b) - 200 pmol (Invitrogen Life Technologies[®])
32. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) BMJ41mod (forward; 5'-GGCTTTAAAATCTCATTCA - 3', [nt] 1-23); Alfieri et al. (1999b) - 200 pmol (Invitrogen Life Technologies[®])
33. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) BJB (reverse; 5'-AGCCACATAGTTCACATTTCA-3' [nt] 1333-1353); Bánya et al. (2006) - 200 pmol (Invitrogen Life Technologies[®])
34. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) GrCVP7-20F (forward; 5'-GCTGTCTGACAAACTGGTC - 3'; [nt] 20-38) Rahman et al. (2005) - 200 pmol (Integrated DNA Technologies[®])
35. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) GrCVP7-1062R (reverse; 5'-GCCACATGATCTTGTTTACGC - 3'; [nt] 1042-1062); Rahman et al. (2005) - 200 pmol (Integrated DNA Technologies[®])
36. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) GCR-SG-VP4-F (forward; 5'-GATCAATGGCGTCCTCACTTT - 3'; [nt] 1-21); Lee et al. (2011) - 200 pmol (Integrated DNA Technologies[®])
37. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) GCR-SG-VP4-R (reverse; 5'-TAGTGAGTCTTTACTTACTAC - 3'; [nt] 780-800); Lee et al. (2011) - 200 pmol (Integrated DNA Technologies[®])
38. PCR-buffer (10x) (200 mM Tris-HCl, pH 8.4, 500 mM KCl) (Invitrogen Life Technologies[™])
39. *Platinum* Taq DNA Polymerase recombinant 500 units (Invitrogen Life Technologies[™])
40. QuantIT[™] dsDNA BR assay kit (Invitrogen Life Technologies[™])
41. Sacarose, P.A. – sucrose (C₁₂H₂₂O₁₁) P.M. 342,31 (Reagen[®])
42. *Superscript TM II RNase H - Reverse Transcriptase* – 200 unidades/sL (Invitrogen Life Technologies[™])
43. Triton x-100

ANEXO B
Soluções e Tampões

- **Diluição dos primers**

PCR para amplificação do gene VP6 parcial

Primer forward - BMJ41

Concentração: 26,17 nmol

Data de fabricação: out/2009

$26,17 \times 1000 = 26170 \text{ pmol}$

$26170 / 200 = 130,85 \text{ } \mu\text{L}$ de água ultrapura

Primer reverse – BMJ42

Concentração: 24,85 nmol

Data de fabricação: out/2009

$24,85 \times 1000 = 24850 \text{ pmol}$

$24850 / 200 = 124,25 \text{ } \mu\text{L}$ de água ultrapura

PCR para amplificação do gene VP6 completa

Primer forward - BMJ41 mod

Concentração: 18,15 nmol

Data de fabricação: jul/2009

$18,15 \times 1000 = 18150 \text{ pmol}$

$18150 / 200 = 90,75 \text{ } \mu\text{L}$ de água ultrapura

Primer reverse – BJB

Concentração: 19,23 nmol

Data de fabricação: jul/2009

$19,23 \times 1000 = 19230 \text{ pmol}$

$19230 / 200 = 96,15 \mu\text{L}$ de água ultrapura

PCR para amplificação do gene VP7

Primer forward - GrCVP7-20F

Concentração: 36,9 nmol

Data de fabricação: dez / 2012

$36,9 \times 1000 = 36900 \text{ pmol}$

$36900 / 200 = 184,5 \text{ } \mu\text{L}$ de água ultrapura

Primer reverse - GrCVP7-1062R

Concentração: 45,7 nmol

Data de fabricação: dez / 2012

$45,7 \times 1000 = 45700 \text{ pmol}$

$45700 / 200 = 228,5 \mu\text{L}$ de água ultrapura

PCR para amplificação do gene VP4

Primer forward - GCR-SG-VP4-F

Concentração: 34,8 nmol

Data de fabricação: dez / 2012

$34,8 \times 1000 = 34800 \text{ pmol}$

$34800 / 200 = 174 \text{ } \mu\text{L}$ de água ultrapura

Primer reverse - GCR-SG-VP4-R

Concentração: 38,1 nmoles

Data de fabricação: dez /2012

$38,1 \times 1000 = 38100 \text{ pmol}$

$38100 / 200 = 190,5 \text{ } \mu\text{L}$ de água ultrapura

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

Solução de uso para todos os primers: diluir 1:10 a solução estoque (10x)

Concentração final: 20 pmol/ μL

- **Diluição de dNTP**
 - solução estoque (100 mM) – 250 µL de cada dNTP
 - solução uso (10 mM) – 10 µL da solução estoque + 90 µL de água ultrapura autoclavada

- **Fenol / clorofórmio – álcool isoamílico (25:24:1)**
 - 25 mL fenol saturado em água
 - 24 mL clorofórmio
 - 1 mL álcool isoamílico

- **Gel de agarose 1-2%**
 - 0,5-1 g agarose
 - 50 mL de tampão TBE 1x
 - 25 µL de brometo de etídio

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

- **SDS 10%**
 - 5 g dodecil sulfato de sódio – Lauril sulfato de sódio – SDS (C₁₂H₂₅NaO₄S)
 - água bidestilada q.s.p. 50 mL

- **Solução L6**
 - 120 g de isotiocianato de guanidina (GUSCN)
 - 100 mL de TRIS-HCl 0,1 M pH 6,4

- 22 mL de EDTA 0,2 M pH 8,0
- 2,6 g de Triton 100

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

- **Tampão de corrida – TBE (Tris – Ácido bórico – EDTA) 10x**
 - Tris 0,89 M
 - Ácido bórico 0,89 M
 - EDTA 0,02 M
 - água bidestilada q.s.p. 1 litro
 - ajustar o pH (pH 8,4)

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

ANEXO C
Protocolos e Técnicas

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

1. *Suspensão fecal – extração bruta*

- 100 μ L ou 100 mg de fezes
- 500 μ L de TRIS/Ca⁺⁺ 1x
- Vortexar
- Centrifugar a 5000 x g / 3 min
- Utilizar 500 μ L do sobrenadante para extração

2. *Extração do ácido nucleico*

Fase I – Fenol

- 500 μ L da suspensão fecal
- Adicionar 50 μ L de SDS 10%
- Homogeneizar em *vortex*
- Banho-maria 56 °C /20 min
- Centrifugar 10.000 x g /30 s
- Adicionar 500 μ L de fenol/clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1)
- Homogeneizar em *vortex*
- Banho-maria 56 °C /15 min
- Homogeneizar manualmente por 15 s
- Centrifugar 10.000 x g /10 min
- Recolher o sobrenadante em outro microtubo

Fase II – Sílica / isotiocianato de guanidina

- Adicionar 500 μ L da solução L6
- Adicionar 25 μ L de sílica hidratada
- Homogeneizar em *vortex*

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

- **RT-PCR para amplificação dos genes VP6, VP7 e VP4 do RVC**
- na amplificação dos genes VP6 (parcial e completo), VP7 e VP4 foi utilizado o mesmo protocolo de *mix* na RT-PCR, diferindo apenas no primer específico para cada gene.

- *Mix* de desnaturação

Reagentes	Volume (μL)
<i>Primer Forward</i> (20 pmol)	1
<i>Primer Reverse</i> (20 pmol)	1
Água DEPC	3
RNA	5
Volume final	10

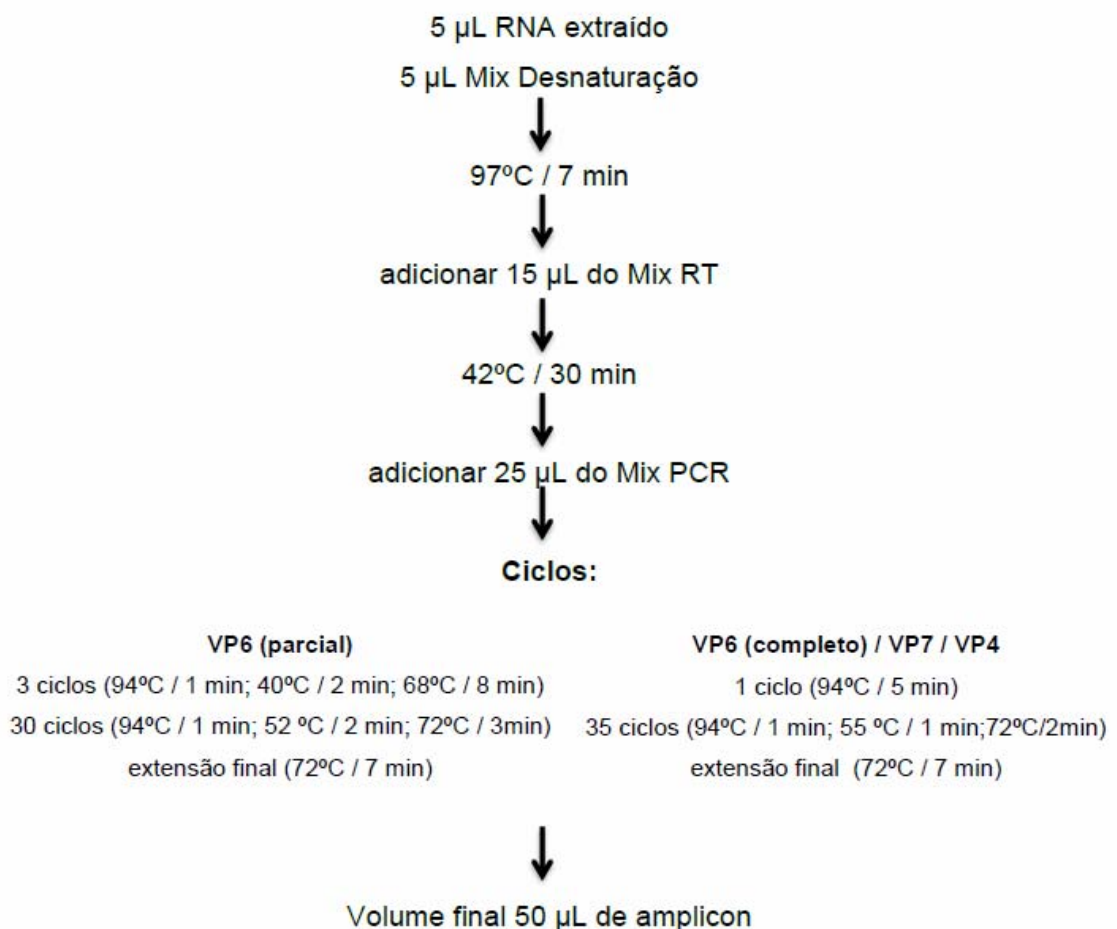
- *Mix* de RT

Reagentes	Volume (μL)
<i>Buffer</i> 10 x (pH 8,4)	2,5
MgCl_2	2,5
dNTP (2,5 mM)	4
<i>Super Script</i> (5U/ μL)	0,15
<i>Primer Forward</i> (20 pmol)	0,5
<i>Primer Reverse</i> (20 pmol)	0,5
Água DEPC	5,85
Produto da desnaturação	10
Volume final	25

- *Mix de PCR*

Reagentes	Volume (μL)
Buffer 10 x (pH 8,4)	2,5
dNTP (2,5 mM)	4
<i>Platinun</i> ®Taq DNA Polymerase (5U/ μL)	0,25
Água DEPC	18,25
cDNA	25
Volume final	50

- Esquema do programa de RT-PCR utilizado para os genes VP6 (parcial e completo), VP7, VP4



- **Eletroforese em gel de agarose a 1-2%**

- 0,5 -1 g de agarose

- 50 mL TBE *buffer* (Tris 89 mM; ácido bórico 89 mM; EDTA 2 mM) pH 8,4

- 25 μ L de brometo de etídio (0,5 μ g / mL)

São utilizados 5 μ L do amplicon e 1 μ L do tampão de amostra. A eletroforese sob voltagem (100 V) e amperagem (80 A) constantes ocorre em aproximadamente 50-90 min.

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

1. Pesar o fragmento excisado do gel em microtubo de 1,5 mL;

2. Adicionar 3 μ L do *Gel Solubilization Buffer* (L3) para cada 1 mg de gel;

3. Incubar o tubo a 50°C /15 min, homogeneizando a cada 3 min;

4. Centrifugar a 12.000 x *g* / 30s;

5. Transferir amostra solubilizada para um tubo coletor com coluna;

6. Centrifugar a 12.000 x *g* / 1min;

7. Descartar o filtrado e recolocar a coluna no mesmo tubo;

8. Adicionar 500 μ L do *Wash buffer* (W1) na coluna com tubo coletor;

9. Centrifugar a 12.000 x *g* / 1 min;

10. Descartar o filtrado e recolocar a coluna no mesmo tubo;

11. Centrifugar a 12.000 x *g* / 1-2 min;

12. Descartar o filtrado e transferir a coluna para um microtubo de 1,5 mL.

13. Adicionar 30 μ L do *Elution buffer* (E5);

14. Incubar a temperatura ambiente por 1 min.

15. Centrifugar a 12.000 x *g* / 1 min.

16. Proceder com a etapa de quantificação ou estocar o fragmento de DNA purificado a -20°C.

- **Quantificação de produto de PCR**

(Certificar-se de que todos os reagentes estão em temperatura ambiente)

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

ANEXO D

Lista de Softwares

- *Electropherogram quality analysis - Phred e CAP3*
(<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>)
- *BLAST - The Basic Local Alignment Search Tool*
(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)
- *MEGA package software version 6.05*
(<http://www.megasoftware.net/>)
- *BioEdit software version 7.2.5*
(<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>)