

ADRIANA LUCHS

**POTENCIAL ZONÓTICO DOS ROTAVÍRUS: DIVERSIDADE GENÉTICA E
TRANSMISSÃO INTERESPÉCIE**

Tese apresentada junto ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Coordenadoria do Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo para a obtenção do título de doutor.

Área de Concentração:
Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública

Orientador: Prof^a Dr^a Maria do Carmo Sampaio Tavares Timenetsky

SÃO PAULO

2014

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de Controle de Doenças/SES-SP

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Luchs, Adriana

Potencial zoonótico dos rotavírus: diversidade genética e transmissão interespecífica / Adriana Luchs – São Paulo, 2014.

Tese (doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo.

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública
Orientadora: Maria do Carmo Sampaio Tavares Timenetsky

1. Rotavírus
2. Zoonoses
3. Gastroenterites
4. Vigilância Epidemiológica

SES/CCD/CD-286/13

Este trabalho contou com o apoio financeiro do



**Programa de Pós Graduação
em Ciências**

Coordenadoria de Controle de Doenças-CCD
Secretaria de Estado da Saúde – São Paulo/SP

Infectologia em Saúde Pública – Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública

Programa de Pós Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças
da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo-PPG-CCD-SES/SP

“Sueña y seras libre de espíritu, lucha y seras libre en la vida”

Ernesto Che Guevara

“Emancipate yourselves from mental slavery.

None but ourselves can free our minds”

Bob Marley

*“Seja bom o suficiente para evitar o conflito.
Reaja na proporção da necessidade. Kidá!”*

Grão Mestre Krav Magá Imi Lichtenfeld

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof^a Dra Maria do Carmo Sampaio Tavares Timenetsky, meus sinceros agradecimentos pela confiança e conhecimentos repassados, propiciando a execução desse trabalho.

Aos colegas do Centro de Virologia pelo apoio e força recebidos.

Aos colegas do Núcleo de Doenças Entéricas pela ajuda e convivência.

Aos meus parentes e amigos por todo o carinho e amizade recebida.

Aos amigos pós-graduandos do Programa de Pós Graduação em Ciências – CCD/SES.

Aos funcionários do Programa de Pós Graduação em Ciências- CCD/SES por todos os serviços e orientação prestados no decorrer deste trabalho.

Aos todos os funcionários do Instituto Adolfo Lutz, em especial do Centro de Virologia, que atuam no dia-a-dia de forma silenciosa, realizando um trabalho tão importante de apoio aos pós-graduandos.

A todos que direta e indiretamente ajudaram na realização deste trabalho.

RESUMO

POTENCIAL ZONÓTICO DOS ROTAVÍRUS: DIVERSIDADE GENÉTICA E TRANSMISSÃO INTERESPÉCIE

Rotavirus do grupo A (RVA) foi detectado em 19,1% (1181/6196) dos casos, com menor frequência (19,5%) entre as crianças ≤ 5 anos quando comparado à crianças em idade escolar (6-18 anos) (40,6%). Os genótipos de RVA mostrou distribuição diferente a cada ano: G2P[4] em 2007-2010, G9P[8] em 2011 e G12P[8] em 2012. O pico de incidência das infecções causadas por RVA deslocou de junho-agosto para setembro. A vacinação em massa pode reduzir o número de indivíduos susceptíveis, retardando o tempo de atividade do RVA e alterando seu padrão sazonal em todo o país. A tendência do RVA em infectar crianças mais velhas após a implantação da vacina tem sido observada em todo o mundo, provavelmente devido à imunidade coletiva. A emergência de G2P[4] segue uma tendência mundial ditada pelas flutuações oscilatórias dos genótipos de RVA e, provavelmente, não está relacionada à vacinação. Aparentemente, G12 está emergindo na população brasileira, assim como o observado em todo o mundo. Em 2009, cepas incomuns de RVA G8P[6] (IAL- RN376 e IAL- RN377) foram detectadas em crianças indígenas. A sequência G8 da cepa IAL-RN376 compartilha um clado com cepas bovinas e humanas, exibindo maior identidade de nucleotídeos com as cepas humanas africanas DRC86 (98,9% nt; 99,6% aa) e DRC88 (98,7% nt; 99,3% aa), seguido pela cepa bovina africana NGRBg8 (95,7% nt; 97% aa). As sequências P[6] das cepas IAL-RN376 e IAL-RN377 exibiram maior identidade genômica com a cepa humana R330 (99,4-99,6% nt; 98,4-99,2% aa) detectada na Irlanda e uma relação genética próxima com a cepa RVA de morcego africano KE4852/07 (94,6-94,7% nt; 94,2-95% aa). Estes dados sugerem que um rearranjo entre cepas de RVA de origem bovina e de quirópteros poderia ter ocorrido em hospedeiro(s) animai(s) antes de sua transmissão para os seres humanos. A cepa incomum de RVA G3P[3] (IAL-R2638) foi detectada em uma criança de 1 ano de idade em 2011. O gene VP7 da cepa IAL-R2638 apresentou maior identidade de nucleotídeos com as cepas caninas A79-10 (96,3% nt; 98,8% aa) e CU-1 (95,8% nt;

98,8% aa) isoladas nos EUA. A sequência VP4 apresentou maior identidade de nucleotídeos com a cepa canina P[3] RV52/96 isolada na Itália (94,2% nt; 96,8% aa). Esses dados reforçam a hipótese de que cepas de RVA de origem animal são capazes de atravessar a barreira entre as espécies. Em 2012, uma cepa incomum de RVA G10P[?] (IAL-R2803) foi detectada em um paciente de 3 anos de idade, na cidade de Presidente Prudente. O gene VP7 da cepa IAL-R2803 apresentou maior identidade de nucleotídeos com a cepa bovina DQ-75, isolada na China em 2008 (94,6% nt; 98,9% aa). Não seria surpresa que uma cepa G10, sabidamente circulante em rebanhos bovinos, fosse detectada em uma criança habitante da mesma região. No entanto, também é possível que um ou mais dos seus outros segmentos sejam derivados de cepas humanas de RVA, originando um recombinante humano-animal. O rotavírus grupo C (RVC) foi detectado em 0,2% (15/6196) dos casos. Este estudo adiciona mais evidências de que o RVC é um agente etiológico pouco relacionado à gastroenterite aguda em crianças no Brasil e não sugere que possa assumir importância epidemiológica no futuro, mesmo após a introdução da vacina contra RVA. Todas as cepas de RVC analisadas no presente estudo foram caracterizadas como pertencentes ao genótipo humano (G4-P[2]-E2) e não apresentaram nenhuma evidência de ancestralidade animal. Todos os quatro genes (VP7, VP4, VP6 e NSP4) das cepas de RVC isoladas em 2007-2008 exibiram estreita relação filogenética com cepas humanas de RVC isoladas na China e no Japão, sugerindo que as mesmas estão geneticamente relacionadas e que um fluxo gênico pode estar ocorrendo entre estes países asiáticos e o Brasil. A árvore filogenética do gene NSP4 permitiu a identificação de dois grupos geneticamente diferentes. Um grupo é formado exclusivamente por cepas humanas de RVC brasileiras detectadas em 1997 e 2003-2004, nos Estados do Rio de Janeiro, Bahia e Rio Grande do Sul (Subgrupo II), as quais apresentam baixa identidade nucleotídica quando comparadas a outras cepas humanas, incluindo as cepas de RVC detectadas no Estado de São Paulo e analisadas no presente estudo (Subgrupo I). Estes dados sugerem à existência de dois perfis genéticos distintos do gene NSP4 circulando no Brasil.

ABSTRACT

ZOONOTIC POTENTIAL OF ROTAVIRUS: GENETIC DIVERSITY AND INTERSPECIES TRANSMISSION

Group A Rotavirus (RVA) was detected in 19.1% (1181/6196); incidence peaked in September. RVA was detected less frequently (19.5%) among children ≤ 5 years than in older children (6-18 years) (40.6%). RVA Genotype distribution showed a different profile for each year: G2P[4] from 2007 to 2010, G9P[8] in 2011, and G12P[8] in 2012. The peak of RVA infections moved from June-August to September. Widespread vaccination may reduce the number of susceptible individuals, delaying the timing of RVA activity and altering its seasonal pattern across the country. A tendency of RVA-related cases to affect older children after vaccine implementation has been observed worldwide, probably due to herd immunity. G2P[4] emergence most likely follows a global trend dictated by the oscillatory fluctuations of RVA genotypes seemingly unrelated to vaccination. G12 apparently is emerging in Brazilian population as observed worldwide. In 2009, unusual strains of RVA G8P[6] (IAL-RN376 and IAL-RN377) genotype were detected in Brazilian indians children. IAL-RN376 G8 sequence shares a clade with bovine and human strains, displaying highest nucleotide identity to African human strains DRC86 (98.9% nt; 99.6% aa) and DRC88 (98.7% nt; 99.3% aa), and following by African bovine NGRBg8 strain (95.7% nt; 97% aa). IAL-RN376 and IAL-RN377 P[6] sequences showed highest identity to human R330 strain (99.4-99.6% nt; 98.4-99.2% aa) from Ireland, and closely genetic relationship to African fruit bat RVA strain KE4852/07 (94.6-94.7% nt; 94.2-95% aa). These data suggests that a reassortment between bovine and bat RVA strains could have occurred in animal host(s) preceding the transmission to human. The unusual RVA G3P[3] (IAL-R2638) strain was detected from a 1-year-old child patient in 2011. The VP7 gene of the IAL-R2638 strain displayed the highest nucleotide identity to the canine strains A79-10 (96.3% nt; 98.8% aa) and CU-1 (95.8% nt; 98.8% aa) isolated in USA. The VP4 sequence showed the highest nucleotide identity to P[3] canine RVA strain RV52/96 isolated in Italy at 94.2% nt (96.8% aa). These data reinforces the hypothesis that

animal's RVA might be able to cross the species barriers. In 2012, an unusual RVA G10P[?] (IAL-R2803) strain was detected from a 3-year-old patient in the city of Presidente Prudente. The VP7 gene of IAL-R2803 showed highest nucleotide identity to the bovine strain DQ-75, isolated in China in 2008 (94.6% nt; 98.9% aa). It was not surprising that G10 strain, known to circulate in bovine herds, was detected in a Brazilian child living in this region. Nevertheless it is also possible that one or more of its other segments were derived from human RVA strains making it a human-animal reassortant. Group C rotavirus (RVC) was detected in 0.2% (15/6196). This study adds further proof that RVC is a minor cause of acute childhood gastroenteritis in Brazil, and does not suggest that RVC may be assume epidemiological importance in the future, even after the RVA vaccine introduction. All RVC strains analyzed in the present study grouped into human genotype (G4-P[2]-E2), and did not show any evidence of animal ancestry. All four genes (VP7, VP4, VP6 and NSP4) of RVC strains isolated in 2007-2008 exhibited close phylogenetic relationship with human RVC strains isolated in China and Japan, suggesting that they are genetically linked, and that a gene flow could be occurring between this Asian countries and Brazil. We identified two distinct clusters in the NSP4 phylogenetic tree. One cluster formed exclusively by human Brazilian strains detected in 1997 and 2003-2004 in the states of Rio de Janeiro, Bahia, and Rio Grande do Sul (Subgroup II), that displayed low sequence identities to other human strains, including the São Paulo RVC strains analyzed in the present study (Subgroup I). These data suggests the circulation of two genetic profiles of the NSP4 gene in Brazil.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

% - Percentagem

≥ - Maior ou igual

> - Maior

≤ - Menor ou igual

< - Menor

~ - Aproximadamente

°C - Graus Celsius

Å - Angstrom

ACIP - *Advisory Committee on Immunization Practices*

AGMK - *African Green Monkey Kidney Cells* (Células de rim de macaco verde africano)

AVE - tampão AVE

AVL - tampão AVL

AW1 - tampão AW1

AW2 - tampão AW2

BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool*

CA - Estado Americano da *Califórnia*

Ca²⁺ - Íon cálcio

CaCo2 - *Human Epithelial Colorectal Adenocarcinoma Cells*

Cap - Enzimas guanilil-transferase e metil-transferase

CDC - *Center for Disease Control and Prevention*

cDNA - Ácido desoxirribonucléico complementar

CEPIAL - Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz

Cl⁻ - Íon cloro

cm³ - Centímetro cúbico

CNS - Conselho Nacional de Saúde

CsCl - Cloreto de céσιο

CTL - Linfócitos T citotóxicos

cut-off - Limite ou ponto de terminação

CVE - Centro de Vigilância Epidemiológica

dATP - Desoxiadenosina trifosfato
dCTP - Desoxicitosina trifosfato
DDA - Doença Diarreica Aguda
DF - Distrito Federal
dGTP - Desoxiguanosina trifosfato
DLP - *Doble-layered particle* (partícula com dupla camada)
DMSO - Dimetilsulfóxido
DNA - Ácido desoxirribonucléico
dNTP - Desoxinucleotídeo trifosfato
dTTP - Desoxitimina trifosfato
EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético
EGPA - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida
EIA - Ensaio Imunoenzimático
ELISA - *Enzyme linked immunosorbent assay* (Ensaio imunoenzimático)
Env - *Environmental* (Ambiental)
EUA - Estados Unidos da América
FASTA - Formato baseado em texto para representar tanto sequências de nucleotídeos quanto sequências de peptídeos
g - Grama
G - Glicoproteína
GACVS - *Global Advisory Committee on Vaccines Safety* (Comitê Global de Aconselhamento em Segurança Vacinal)
GAVI Alliance - *Global Alliance for Vaccines and Immunization* (Aliança Global para Vacinas e Imunização)
GE - *General Electric*
GenBank - Banco de sequências genéticas
GO - Estado de Goiás
HCl - Ácido clorídrico
HIV - *Human immunodeficient Virus* (Vírus da imunodeficiência humana)
Hsc70 - *Heat shock cognate protein 70* (proteína de choque térmico cognato)
IAL - Instituto Adolfo Lutz

ICMS - Imposto sobre circulação de mercadorias e prestação de serviços

ICTV - *International Committee on Taxonomy of Viruses* (Comitê Internacional de Taxonomia Viral)

IgA - Imunoglobulina A

IgG - Imunoglobulina G

IgM - Imunoglobulina M

INF - Interferon

INF-a - Interferon – Alpha

INF-b - Interferon – Beta

IRF3 - *IFN regulatory factor 3* (Fator regulatório de INF 3)

K⁺ - Íon potássio

Kb - Kilobases

K-Da - Kilo Dalton

km - Quilômetros

lab - *Laboratory generated* (gerado em laboratório)

LLR - *Lanzhou Lamb Rotavirus Vaccine*

M - Molaridade

mA - Milliampere

MA-104 - Células de linhagem de rim fetal de macaco *Rhesus*

MAbs - Anticorpos monoclonais

MDBK - *Madin and Darby Bovine Kidney cells*

MDG - *Millennium Development Goals* (Metas de Desenvolvimento do Milênio)

MEGA - *Molecular Evolutionary Genetics Analysis*

MgCl₂ - Cloreto de Magnésio

MilliQ - Água ultrapura tipo 1

mL - Mililitro (10^{-3} Litro)

mM - Milimolar (10^{-3} Molar)

MO - Estado americano do *Missouri*

MS - Estado de Mato Grosso do Sul

MS - Ministério da Saúde

MT - Estado de Mato Grosso

Na⁺ - Íon Sódio

NaCl - Cloreto de sódio

NaOH - Hidróxido de Sódio

NCBI - *National Center for Biotechnology Information* (Centro Nacional para Informação e Biotecnologia)

NCDR - *Neonatal Calf Diarrhea Reovirus-like*

NCDV - *Nebraska Calf Diarrhea Virus*

NDE - Núcleo de Doenças Entéricas

NF-κB - *Nuclear Factor-KappaB* (Fator nuclear Kappa B)

ng - nanograma

NJ - *Neighbour-Joining*

NJ - Estado Americano de *New Jersey*

NK - *Natural Killers*

nm - Nanômetro (10^{-9} Metro)

NSP - Proteínas não estruturais

OH - Estado Americano de *Ohio*

ONU - Organização das Nações Unidas

OMS - Organização Mundial da Saúde

ORF - *Open Reading Frame* (quadro aberto de leitura)

P - Proteína sensível à protease

PAGE - *Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (Eletroforese em gel de poliacrilamida)

pb - Pares de base

PCR - *Polymerase Chain Reaction* (Reação em cadeia pela polimerase pós-transcrição reversa)

pH - Potencial hidrogeniônico

PK-15 - Célula de rim suíno

PLC-IP3 - Fosfolipase C – Inositol 1,3,5 trifosfato

PM - Peso Molecular

PMDDA - Programa de Monitoramento das Doenças Diarreicas Agudas

PNI - Programa Nacional de Imunização

Pol - Enzima polimerase viral

PR - Estado do Paraná

RCWG - *Rotavirus Classification Working Group* (Grupo de Trabalho para Classificação de Rotavírus)

RER - Retículo Endoplasmático Rugoso

RFLP - *Restriction Fragment Length Polymorphism*

RNA - Ácido ribonucléico

RNA_{df} - RNA de fita dupla

RNA_i - RNA de interferência

RNA_m - RNA mensageiro

RNA_{se} - Enzima hidrólise de ácido ribonucléico

RPHA - *Reverse Passive Hemagglutination Test* (Teste de Hemaglutinação Passiva Reversa)

RT-PCR - *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction* (Reação em cadeia pela polimerase pós-transcrição reversa)

RT_q-PCR - Reação em tempo real em cadeia pela polimerase pós-transcrição reversa

RV - Rotavírus

RVA - Rotavírus grupo A

RVB - Rotavírus grupo B

RVC - Rotavírus grupo C

RVD - Rotavírus grupo D

RVE - Rotavírus grupo E

RVF - Rotavírus grupo F

RVG - Rotavírus grupo G

RVH - Rotavírus grupo H

SA11 - *Simian rotavirus SA11* (rotavírus símio SA11)

SC - Estado de Santa Catarina

SDS - Sulfato duodecil de sódio

SG - Subgrupo

SLP - *Single-layered particle* (partícula com camada simples)

SNE - Sistema Nervoso Entérico

SP - Estado de São Paulo

Taq DNA polimerase - Enzima DNA polimerase extraída da bactéria *Thermus aquaticus*

TBE - TRIS-Ácido bórico-EDTA

tc - *Tissue culture adapted* (adaptado de cultura de tecido)

TEMED - tetrametiletilenodiamina

TLP - *Triple-layered particle* (partícula com tripla camada)

TO - Estado de Tocantins

TRIS - Tris-hidroximetil-aminometano

TRO - Terapia de Reidratação Oral

TRI - Terapia de Reidratação Intravenosa

µg - Micrograma (10^{-6} gramas)

µL - Microlitro (10^{-6} Litro)

µM - Micromoles

UV - Ultravioleta

V - Volts

VIGOR - *Viral Genome ORF Reader* (Leitor de ORF do genoma viral)

VIP - Viroplasma

VP - Proteína viral

Xg - Força centrífuga gerada em unidades de gravidade

wt - *Wild-type* (tipo selvagem)

WHO - *World Health Organization* (Organização Mundial da Saúde)

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Partículas de RV observadas ao microscópio eletrônico. A barra representa 100 nm (1.000 Å).....54
- Figura 2.** Representação esquemática da estrutura da partícula de RV símio (SA11). A figura mostra a correspondência entre os segmentos de RNA_{df} (a esquerda), o diagrama esquemático (a direita no alto) e a estrutura tridimensional do vírus por criomicroscopia (a direita abaixo).....56
- Figura 3.** Criomicrografia eletrônica de uma amostra fecal contendo partículas de RV com tripla e dupla camada (TLP e DLP). As TLPs são maiores e apresentam uma suave aparência circular, enquanto as DLPs são menores e exibem perfis pontiagudos. Os quadros na parte inferior da figura mostram imagens ampliadas de duas TLPs (à esquerda) e duas DLPs (à direita). A barra representa 100 nm (1.000 Å).....57
- Figura 4.** Reconstrução em 3-D de partículas de RV. As reconstruções em 3-D possuem uma resolução de ~2,5nm e mostram a estrutura em camadas das partículas virais. A reconstrução da esquerda representa uma DLP composta por duas camadas protéicas, sendo a interna formada pela proteína VP2 (em amarelo) e a externa formada pela proteína VP6 (em vermelho). A reconstrução da direita representa uma TLP composta por três camadas. O core (amarelo) não visível esta localizada dentro da camada intermediária formada pela proteína VP6 (vermelho). A camada mais externa é composta pelas proteínas VP7 (em azul) e VP4 (em verde). A barra representa 100 nm (1.000 Å).....59
- Figura 5.** Representação esquemática da estrutura dos segmentos dos RV. A região aberta de leitura (ORF – *Open Reading Frame*) do genoma é limitada em ambas extremidades por sequências não codificadoras de tamanhos variáveis. A única homologia entre os 11 segmentos dos RV encontra-se nas sequências curtas localizadas nas extremidades 5' e 3' (evidenciadas na figura).....64

Figura 6. Representação esquemática das estruturas secundárias formadas pelas regiões não codificadoras das extremidades 5' e 3' do segmento 8 do RV SA11. (a) Representação da cauda poli U – poli A comum a todas as regiões não codificadoras da extremidade 5' dos 11 segmentos de RV, as quais podem formar uma estrutura em forma de haste imediatamente após os resíduos GGC 5' terminal. (b) Representação esquemática das 28pb localizadas na região 3' terminal do gene 8 dos RV. Essa porção inclui a região promotora essencial para a replicase viral (core de reconhecimento da polimerase), o sítio de ligação para a proteína NSP3 e uma região rica em purina. O códon de parada e o triplex de AUG também estão representados na figura.....65

Figura 7. Representação esquemática do gene 9 (ou gene 8) dos RVA que codifica para a glicoproteína VP7. Os quadradros brancos representam a regiões hipervariáveis do genoma (A-F); AA representa a posição dos aminoácidos; NA representa a posição dos nucleotídeos.....68

Figura 8. Esquema de replicação dos RV.....72

Figura 9. Principais eventos da patogenia da infecção por RV no epitélio intestinal. As células em cinza representam enterócitos e a célula em laranja a célula da cripta. Vi: viroplasma; triângulo vermelho: NSP4; ENS: sistema nervoso entérico.....75

Figura 10. Eletroforese em gel de poliacrilamida evidenciando o padrão de migração característico dos 11 segmentos de RNAdf dos RVA, RVB e RVC.....78

Figura 11. Eletroforese em gel de poliacrilamida evidenciando o padrão de migração característico dos 11 segmentos de RNAdf de RVA. Os números a esquerda indicam os segmentos de RNAdf referentes as quatro regiões variáveis do genoma e suas respectivas classes. As linhas 1 e 2 evidenciam amostras de RVA que apresentam padrão longo de migração eletroforética, enquanto a linha 3 evidencia amostra de RVA que apresenta padrão curto de migração eletroforética.....80

Figura 12. Comparação de perfis eletroforéticos de RVC em EGPA. Linha 6: cepa K9304 que exhibe padrão III; Linha 9: cepa OK118 que exhibe padrão I; Linha 11: cepa OK450 que exhibe padrão II. Linhas 1-5, 7, 8 e 10 representam os perfis eletroforéticos de outros RVC isolados no período entre novembro/1992 e abril/1993 a partir de pacientes com gastroenterite aguda proveniente de hospitais localizados em 10 prefeituras diferentes no Japão. Os números romanos a esquerda indicam os segmentos de RNAdf referentes as quatro regiões variáveis do genoma e suas respectivas classes.....112

Figura 13. Os estados de Mato Grosso (MT), Tocantins (TO), Goiás (GO), Mato Grosso do Sul (MS), São Paulo (SP), Paraná (PR), Santa Catarina (SC) e o Distrito Federal (DF), destacados preto no mapa, compõem o conjunto de estados das regiões Sul, Centro-Oeste e Sudeste que atuam na vigilância das gastroenterites virais tendo o NDE-IAL como centro de referência macrorregional.....129

Figura 14. Representação esquemática do gene que codifica para a proteína VP7 dos RVA. A figura exhibe a localização das regiões variáveis, posição dos primers, tamanho dos respectivos produtos de PCR amplificados e os genótipos correspondentes....145

Figura 15. Representação esquemática do gene que codifica para a proteína VP4 dos RVA. A figura exhibe a localização das regiões variáveis, posição dos primers, tamanho dos respectivos produtos de PCR amplificados e os genótipos correspondentes....146

Figura 16. Distribuição sazonal da positividade de detecção de RVA em amostras coletadas de crianças, adultos e idosos nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil durante a vigilância nacional dos RV no período compreendido entre Junho de 2007 e Junho de 2012.....158

Figura 17. Mapa representando a localização da cidade de Dourados no Brasil e no Estado de Mato Grosso do Sul.....166

Figura 18. Mapa representado a localização da cidade de Guarulhos no Brasil e no Estado de São Paulo.....167

Figura 19. Mapa representado a localização da cidade de Presidente Prudente no Brasil e no Estado de São Paulo.....168

Figura 20. Matriz de identidade das sequências nucleotídicas parciais do gene VP7 de RVA genótipo G8 gerada com o software *BioEdit* (Ibis Therapeutics, EUA). A cepa IAL-RN376 foi detectada em uma criança de 6 meses de idade apresentando gastroenterite aguda proveniente de uma comunidade indígena localizada na cidade de Dourados, Estado do Mato Grosso do Sul (MS), Brasil. Sequências G8 de referência foram obtidas a partir do *GenBank*.....173

Figura 21. Figura 21. Árvore genealógica do tipo *Neighbor-Joining* (NJ) da sequência nucleotídica parcial gene VP7 de RVA genótipo G8 da cepa IAL-RN376 (retângulo vermelho) gerada com o software MEGA 4.0. A cepa IAL-RN376 foi detectada em uma criança de 6 meses de idade apresentando gastroenterite aguda proveniente de uma comunidade indígena localizada na cidade de Dourados, Estado do Mato Grosso do Sul (MS), Brasil. Sequências G8 de referência foram obtidas a partir do *GenBank*. O retângulo verde destaca as cepas de RVA com maior percentual de similaridade em relação a cepa IAL-RN376. Os números romanos de I a VI representam 6 linhagens geneticamente distintas. As espécies e os números de acesso de cada cepa estão indicados. As siglas dos países de cada cepa estão descritas no Anexo 1. A escala indica a diversidade genética. Percentuais dos valores de *bootstrap* estão localizados nos nós dos ramos.....174

Figura 22. Alinhamento da sequência de aminoácidos deduzida a partir da sequência de nucleotídeos do gene VP7 entre a cepa G8 IAL-RN376 e as cepas protótipos. As regiões hipervariáveis A-F estão indicadas. Os sítios de glicosilação N (aminoácidos 69 e 238) estão indicados por asteriscos. As abreviações referentes aos aminoácidos estão listadas no Anexo 2.....175

Figura 23. Matriz de identidade das sequências deduzidas de aminoácidos a partir das sequências nucleotídicas parciais do gene VP7 de RVA genótipo G8 gerada com o software *BioEdit* (Ibis Therapeutics, EUA). A cepa IAL-RN376 foi detectada em uma criança de 6 meses de idade apresentando gastroenterite aguda proveniente de uma comunidade indígena localizada na cidade de Dourados, Estado do Mato Grosso do Sul (MS), Brasil. Sequências G8 de referência foram obtidas a partir do *GenBank*....176

Figura 24. Árvore genealógica do tipo *Neighbor-Joining* (NJ) da sequência aminoácidos deduzida a partir da sequência nucleotídica parcial do gene VP7 de RVA genótipo G8 da cepa IAL-RN376 (retângulo vermelho) gerada com o software MEGA 4.0. A cepa IAL-RN376 foi detectada em uma criança de 6 meses de idade apresentando gastroenterite aguda proveniente de uma comunidade indígena localizada na cidade de Dourados, Estado do Mato Grosso do Sul (MS), Brasil. Sequências G8 de referência foram obtidas a partir do *GenBank*. As espécies e os números de acesso de cada cepa estão indicados. As siglas dos países de cada cepa estão descritas no Anexo 1. A escala indica a diversidade proteica. Percentuais dos valores de *bootstrap* estão localizados nos nós dos ramos.....177

Figura 25. Matriz de identidade das sequências nucleotídicas parciais do gene VP4 de RVA genótipo P[6] gerada com o software *BioEdit* (Ibis Therapeutics, EUA). As cepas IAL-RN376 e IAL-RN377 foram detectadas em crianças de 6 e 3 meses de idade, respectivamente, apresentando gastroenterite aguda provenientes de comunidades indígenas localizadas na cidade de Dourados, Estado do Mato Grosso do Sul (MS), Brasil. Sequências P[6] de referência foram obtidas a partir do *GenBank*.....182

Figura 26. Árvore genealógica do tipo *Neighbor-Joining* (NJ) da sequência nucleotídica parcial do gene VP4 de RVA genótipo P[6] das cepas IAL-RN376 e IAL-RN377 gerada com o software MEGA 4.0. As cepas IAL-RN376 e IAL-RN377 foram detectadas em crianças de 6 e 3 meses de idade, respectivamente, apresentando gastroenterite aguda provenientes de comunidades indígenas localizadas na cidade de Dourados, Estado do Mato Grosso do Sul (MS), Brasil. Sequências P[6] de referência foram obtidas a partir

do *GenBank*. O retângulo verde destaca as cepas de RVA com maior percentual de similaridade em relação às cepas IAL-RN376 e IAL-RN377. O retângulo azul destaca as cepas de RVA com maior percentual de similaridade em relação à cepa de morcego KE4852/07. Os números romanos de I a V representam 5 linhagens geneticamente distintas. As espécies e os números de acesso de cada cepa estão indicados. As siglas dos países de cada cepa estão descritas no Anexo 1. A escala indica a diversidade genética. Percentuais dos valores de *bootstrap* estão localizados nos nós dos ramos.....183

Figura 27. Alinhamento da sequência de aminoácidos deduzida a partir da sequência de nucleotídeos do gene VP4 entre as cepas P[6] IAL-RN376 e IAL-RN377 e as cepas protótipos. Os resíduos conservados de cisteínas (▼), prolinas (●), argininas (■) e a região hipervariável estão indicadas. As abreviações referentes aos aminoácidos estão listadas no Anexo 2.....184

Figura 28. Matriz de identidade das sequências deduzidas de aminoácidos a partir das sequências nucleotídicas parciais do gene VP4 de RVA genótipo P[6] gerada com o software *BioEdit* (Ibis Therapeutics, EUA). As cepas IAL-RN376 e IAL-RN377 foram detectadas em crianças de 6 e 3 meses de idade, respectivamente, apresentando gastroenterite aguda provenientes de comunidades indígenas localizadas na cidade de Dourados, Estado do Mato Grosso do Sul (MS), Brasil. Sequências P[6] de referência foram obtidas a partir do *GenBank*.....185

Figura 29. Árvore genealógica do tipo *Neighbor-Joining* (NJ) da sequência aminoácidos deduzida a partir da sequência nucleotídica parcial do gene VP4 de RVA genótipo P[6] das cepas IAL-RN376 e IAL-RN377 (retângulo vermelho) gerada com o software MEGA 4.0. As cepas IAL-RN376 e IAL-RN377 foram detectadas em crianças de 6 e 3 meses de idade, respectivamente, apresentando gastroenterite aguda provenientes de comunidades indígenas localizadas na cidade de Dourados, Estado do Mato Grosso do Sul (MS), Brasil. Sequências P[6] de referência foram obtidas a partir do *GenBank*. O retângulo azul destaca as cepas de RVA com maior percentual de

similaridade em relação a cepa de morcego KE4852/07. Os números romanos de I a V representam 5 linhagens geneticamente distintas. As espécies e os números de acesso de cada cepa estão indicados. As siglas dos países de cada cepa estão descritas no Anexo 1. A escala indica a diversidade genética. Percentuais dos valores de *bootstrap* estão localizados nos nós dos ramos.....186

Figura 30. Matriz de identidade das sequências nucleotídicas parciais do gene VP7 de RVA genótipo G3 gerada com o software *BioEdit* (Ibis Therapeutics, EUA). A cepa IAL-R2638 foi detectada em uma criança de 1 ano de idade apresentando gastroenterite aguda proveniente de uma creche localizada na cidade de Guarulhos, Estado de São Paulo (SP), Brasil. Sequências G3 de referência foram obtidas a partir do *GenBank*.....190

Figura 31. Árvore genealógica do tipo *Neighbor-Joining* (NJ) da sequência nucleotídica parcial do gene VP7 de RVA genótipo G3 da cepa IAL-R2638 (retângulo vermelho) gerada com o software MEGA 4.0. A cepa IAL-R2638 foi detectada em uma criança de 1 ano de idade apresentando gastroenterite aguda proveniente de uma creche localizada na cidade de Guarulhos, Estado de São Paulo (SP), Brasil. Sequências G3 de referência foram obtidas a partir do *GenBank*. O retângulo verde destaca as cepas de RVA com maior percentual de similaridade em relação à cepa IAL-R2638. A e B representam dois grupos geneticamente diferentes. As espécies e os números de acesso de cada cepa estão indicados. As siglas dos países de cada cepa estão descritas no Anexo 1. A escala indica a diversidade genética. Percentuais dos valores de *bootstrap* estão localizados nos nós dos ramos.....191

Figura 32. Alinhamento da sequência de aminoácidos deduzida a partir da sequência de nucleotídeos do gene VP7 entre a cepa G3 IAL-R2638 e as cepas protótipos. As regiões hipervariáveis A-F estão indicadas. O sítio de glicosilação N (aminoácido 69) está indicado por asteriscos. As abreviações referentes aos aminoácidos estão listadas no Anexo 2.....193

Figura 33. Matriz de identidade das sequências deduzidas de aminoácidos a partir das sequências nucleotídicas parciais do gene VP7 de RVA genótipo G3 gerada com o software *BioEdit* (Ibis Therapeutics, EUA). A cepa IAL-R2638 foi detectada em uma criança de 1 ano de idade apresentando gastroenterite aguda proveniente de uma creche localizada na cidade de Guarulhos, Estado de São Paulo (SP), Brasil. Sequências G3 de referência foram obtidas a partir do *GenBank*.....194

Figura 34. Árvore genealógica do tipo *Neighbor-Joining* (NJ) da sequência aminoácidos deduzida a partir da sequência nucleotídica parcial do gene VP7 de RVA genótipo G3 da cepa IAL-R2638 (retângulo vermelho) gerada com o software MEGA 4.0. A cepa IAL-R2638 foi detectada em uma criança de 1 ano de idade apresentando gastroenterite aguda proveniente de uma creche localizada na cidade de Guarulhos, Estado de São Paulo (SP), Brasil. Sequências G3 de referência foram obtidas a partir do *GenBank*. O retângulo verde destaca as cepas de RVA com maior percentual de similaridade em relação a cepa IAL-R2638. A e B representam dois grupos geneticamente diferentes. As espécies e os números de acesso de cada cepa estão indicados. As siglas dos países de cada cepa estão descritas no Anexo 1. A escala indica a diversidade protéica. Percentuais dos valores de *bootstrap* estão localizados nos nós dos ramos.....195

Figura 35. Matriz de identidade das sequências nucleotídicas parciais do gene VP4 de RVA genótipo P[3] gerada com o software *BioEdit* (Ibis Therapeutics, EUA). A cepa IAL-R2638 foi detectada em uma criança de 1 ano de idade apresentando gastroenterite aguda proveniente de uma creche localizada na cidade de Guarulhos, Estado de São Paulo (SP), Brasil. Sequências P[3] de referência foram obtidas a partir do *GenBank*.....199

Figura 36. Árvore genealógica do tipo *Neighbor-Joining* (NJ) da sequência nucleotídica parcial do gene VP4 de RVA genótipo P[3] da cepa IAL-R2638 (retângulo vermelho) gerada com o software MEGA 4.0. A cepa IAL-R2638 foi detectada em uma criança de 1 ano de idade apresentando gastroenterite aguda provenientes de uma creche

localizada na cidade de Guarulhos, Estado de São Paulo (SP), Brasil. Sequências P[3] de referência foram obtidas a partir do *GenBank*. C e D representam dois grupos geneticamente diferentes. As espécies e os números de acesso de cada cepa estão indicados. As siglas dos países de cada cepa estão descritas no Anexo 1. A escala indica a diversidade genética. Percentuais dos valores de *bootstrap* estão localizados nos nós dos ramos.....200

Figura 37. Alinhamento da sequência de aminoácidos deduzida a partir da sequência de nucleotídeos do gene VP4 entre a cepa P[3] IAL-R2638 e as cepas protótipos. Os resíduos conservados de cisteínas (▼), prolínas (●), argininas (■) e a região hipervariável estão indicadas. As abreviações referentes aos aminoácidos estão listadas no Anexo 2.....202

Figura 38. Matriz de identidade das sequências deduzidas de aminoácidos a partir das sequências nucleotídicas parciais do gene VP4 de RVA genótipo P[3] gerada com o software *BioEdit* (Ibis Therapeutics, EUA). A cepa IAL-R2638 foi detectada em uma criança de 1 ano de idade apresentando gastroenterite aguda proveniente de uma creche localizada na cidade de Guarulhos, Estado de São Paulo (SP), Brasil. Sequências P[3] de referência foram obtidas a partir do *GenBank*.....203

Figura 39. Árvore genealógica do tipo *Neighbor-Joining* (NJ) da sequência aminoácidos deduzida a partir da sequência nucleotídica parcial do gene VP4 de RVA genótipo P[3] da cepa IAL-R2638 (retângulo vermelho) gerada com o software MEGA 4.0. A cepa IAL-R2638 foi detectada em uma criança de 1 ano de idade apresentando gastroenterite aguda proveniente de uma creche localizada na cidade de Guarulhos, Estado de São Paulo (SP), Brasil. Sequências P[3] de referência foram obtidas a partir do *GenBank*. C e D representam dois grupos geneticamente diferentes. As espécies e os números de acesso de cada cepa estão indicados. As siglas dos países de cada cepa estão descritas no Anexo 1. A escala indica a diversidade genética. Percentuais dos valores de *bootstrap* estão localizados nos nós dos ramos.....204

Figura 40. Matriz de identidade das sequências nucleotídicas parciais do gene VP7 de RVA genótipo G10 gerada com o software *BioEdit* (Ibis Therapeutics, EUA). A cepa IAL-R2803 foi detectada em uma criança de 3 anos de idade apresentando gastroenterite aguda proveniente da cidade de Presidente Prudente, Estado de São Paulo (SP), Brasil. Sequências G10 de referência foram obtidas a partir do *GenBank*.....209

Figura 41. Árvore genealógica do tipo *Neighbor-Joining* (NJ) da sequência nucleotídica parcial do gene VP7 de RVA genótipo G10 da cepa IAL-R2803 (retângulo vermelho) gerada com o software MEGA 4.0. A cepa IAL-R2803 foi detectada em uma criança de 3 anos de idade apresentando gastroenterite aguda provenientes da cidade de Presidente Prudente, Estado de São Paulo (SP), Brasil. Sequências G10 de referência foram obtidas a partir do *GenBank*. O retângulo verde destaca as cepas de RVA com maior percentual de similaridade em relação a cepa IAL-R2638. E e F representam dois grupos geneticamente diferentes. Os números romanos de I a VIII representam 8 linhagens geneticamente distintas. As espécies e os números de acesso de cada cepa estão indicados. As siglas dos países de cada cepa estão descritas no Anexo 1. A escala indica a diversidade genética. Percentuais dos valores de *bootstrap* estão localizados nos nós dos ramos.....210

Figura 42. Alinhamento da sequência de aminoácidos deduzida a partir da sequência de nucleotídeos do gene VP7 entre a cepa G10 IAL-R2803 e as cepas protótipos. As regiões hipervariáveis A-D estão indicadas. O sítio de glicosilação N (aminoácidos 69) está indicado por asteriscos. As abreviações referentes aos aminoácidos estão listadas no Anexo 2.....211

Figura 43. Matriz de identidade das sequências deduzidas de aminoácidos a partir das sequências nucleotídicas parciais do gene VP7 de RVA genótipo G10 gerada com o software *BioEdit* (Ibis Therapeutics, EUA). A cepa IAL-R2803 foi detectada em uma criança de 3 anos de idade apresentando gastroenterite aguda proveniente da cidade de Presidente Prudente, Estado de São Paulo (SP), Brasil. Sequências G10 de

referência foram obtidas a partir do *GenBank*.....212

Figura 44. Árvore genealógica do tipo *Neighbor-Joining* (NJ) da sequência aminoácidos deduzida a partir da sequência nucleotídica parcial do gene VP7 de RVA genótipo G10 da cepa IAL-R2803 (retângulo vermelho) gerada com o software MEGA 4.0. A cepa IAL-R2803 foi detectada em uma criança de 3 ano de idade apresentando gastroenterite aguda proveniente de cidade de Presidente Prudente, Estado de São Paulo (SP), Brasil. Sequências G10 de referência foram obtidas a partir do *GenBank*. O retângulo verde destaca as cepas de RVA com maior percentual de similaridade em relação à cepa IAL-R2803. E, F e G (destacado em azul) representam três grupos geneticamente diferentes. Os números romanos I-IV, VI e VIII representam linhagens geneticamente distintas. As espécies e os números de acesso de cada cepa estão indicados. As siglas dos países de cada cepa estão descritas no Anexo 1. A escala indica a diversidade proteica. Percentuais dos valores de *bootstrap* estão localizados nos nós dos ramos.....213

Figura 45. Matriz de identidade das sequências nucleotídicas parciais do gene VP6 de RVC gerada com o software *BioEdit* (Ibis Therapeutics, EUA). As cepas IAL-RC01, IAL-RC09, IAL-RC12, IAL-RC22, IAL-RC28-31, IAL-RC33-36 e IAL-RC59 foram detectadas em pacientes apresentando gastroenterite aguda proveniente da vigilância nacional dos RV entre Junho de 2007 e Junho de 2012. As cepas IAL-RC26 e IAL-RC27 foram detectadas em pacientes apresentando gastroenterite aguda proveniente de um surto na cidade de Valentim Gentil, Estado de São Paulo, em 1993. A cepa IAL-RC76 foi detectada em um paciente apresentando gastroenterite aguda na cidade de São Paulo, Estado de São Paulo, em 1988. Sequências VP6 de referência foram obtidas a partir do *GenBank*.....227

Figura 46. Árvore genealógica do tipo *Neighbor-Joining* (NJ) das sequências nucleotídicas parciais do gene VP6 de RVC das cepas IAL-RC gerada com o software MEGA 4.0. As cepas IAL-RC foram detectadas nos anos de 1988, 1993 e 2007-2008 em pacientes apresentando sintomas de gastroenterite aguda provenientes da

vigilância nacional dos RV. Sequências RVC VP6 de referência foram obtidas a partir do *GenBank*. H e I representam dois grupos geneticamente diferentes. As espécies e os números de acesso de cada cepa estão indicados. As siglas dos países de cada cepa estão descritas no Anexo 1. A escala indica a diversidade genética. Percentuais dos valores de *bootstrap* estão localizados nos nós dos ramos.....228

Figura 47. Alinhamento da sequência de aminoácidos deduzida a partir da sequência de nucleotídeos do gene VP6 de RVC entre as cepas IAL-RC01, IAL-RC09, IAL-RC12, IAL-RC22, IAL-RC26-31, IAL-RC33-36, IAL-RC59 e IAL-RC76 e as cepas protótipos. As regiões altamente conservadas I-VII estão indicadas. As abreviações referentes aos aminoácidos estão listadas no Anexo 2.....232

Figura 48. Matriz de identidade das sequências deduzidas de aminoácidos a partir das sequências nucleotídicas parciais do gene VP6 de RVC gerada com o software *BioEdit* (Ibis Therapeutics, EUA). As cepas IAL-RC01, IAL-RC09, IAL-RC12, IAL-RC22, IAL-RC28-31, IAL-RC33-36 e IAL-RC59 foram detectadas em pacientes apresentando gastroenterite aguda proveniente da vigilância nacional dos RV entre Junho de 2007 e Junho de 2012. As cepas IAL-RC26 e IAL-RC27 foram detectadas em pacientes apresentando gastroenterite aguda proveniente de um surto na cidade de Valentim Gentil, Estado de São Paulo, em 1993. A cepa IAL-RC76 foi detectada em um paciente apresentando gastroenterite aguda na cidade de São Paulo, Estado de São Paulo, em 1988. Sequências VP6 de referência foram obtidas a partir do *GenBank*.....234

Figura 49. Árvore genealógica do tipo *Neighbor-Joining* (NJ) das sequências de aminoácidos deduzidas a partir das sequências nucleotídicas parciais do gene VP6 de RVC das cepas IAL-RC gerada com o software MEGA 4.0. As cepas IAL-RC foram detectadas nos anos de 1988, 1993 e 2007/2008 em pacientes apresentando sintomas de gastroenterite aguda provenientes da vigilância nacional dos RV (retângulos vermelhos). Os retângulos verdes destacam as cepas de RVC com maior percentual de similaridade em relação às cepas IAL-RC. Sequências RVC VP6 de referência foram obtidas a partir do *GenBank*. I1 a I3 representam os genótipos identificados. H e I

representam dois grupos geneticamente diferentes. As espécies e os números de acesso de cada cepa estão indicados. As siglas dos países de cada cepa estão descritas no Anexo 1. A escala indica a diversidade genética. Percentuais dos valores de *bootstrap* estão localizados nos nós dos ramos.....235

Figura 50. Matriz de identidade das sequências nucleotídicas parciais do gene VP7 de RVC gerada com o software *BioEdit* (Ibis Therapeutics, EUA). As cepas IAL-RC01, IAL-RC09, IAL-RC12, IAL-RC22, IAL-RC29-36, IAL-RC43 e IAL-RC59 foram detectadas em pacientes apresentando gastroenterite aguda proveniente da vigilância nacional dos RV entre Junho de 2007 e Junho de 2012. As cepas IAL-RC24, IAL-RC26, IAL-RC27 e IAL-RC37 foram detectadas em pacientes apresentando gastroenterite aguda proveniente de um surto na cidade de Valentim Gentil, Estado de São Paulo, em 1993. A cepa IAL-RC76 foi detectada em um paciente apresentando gastroenterite aguda na cidade de São Paulo, Estado de São Paulo, em 1988. Sequências VP7 de referência foram obtidas a partir do *GenBank*.....240

Figura 51. Árvore genealógica do tipo *Neighbor-Joining* (NJ) das sequências nucleotídicas parciais do gene VP7 de RVC das cepas IAL-RC gerada com o software MEGA 4.0. As cepas IAL-RC foram detectadas nos anos de 1988, 1993 e 2007/2008 em pacientes apresentando sintomas de gastroenterite aguda provenientes da vigilância nacional dos RV (retângulos vermelhos). Os retângulos verdes destacam as cepas de RVC com maior percentual de similaridade em relação às cepas. Sequências RVC VP7 de referência foram obtidas a partir do *GenBank*. G1 a G6 e G8 representam os genótipos identificados. As espécies e os números de acesso de cada cepa estão indicados. As siglas dos países de cada cepa estão descritas no Anexo 1. A escala indica a diversidade genética. Percentuais dos valores de *bootstrap* estão localizados nos nós dos ramos.....241

Figura 52. Alinhamento da sequência de aminoácidos deduzida a partir da sequência de nucleotídeos do gene VP7 de RVC entre as cepas IAL-RC01, IAL-RC09, IAL-RC12, IAL-RC22, IAL-RC24, IAL-RC26, IAL-RC27, IAL-RC29-37, IAL-RC43, IAL-RC59 e IAL-

RC76 e as cepas protótipos. As regiões variáveis de VR-1 a VR-8 estão indicadas. Os três sítios de glicosilação N (Asn-X-Ser/Thr) localizados nos aminoácidos 67-69, 152-154 e 225-227 estão indicados por asteriscos. Os resíduos conservados de cisteína (▼) estão indicados. As abreviações referentes aos aminoácidos estão listadas no Anexo 2.....245

Figura 53. Matriz de identidade das sequências deduzidas de aminoácidos a partir das sequências nucleotídicas parciais do gene VP7 de RVC gerada com o software *BioEdit* (Ibis Therapeutics, EUA). As cepas IAL-RC01, IAL-RC09, IAL-RC12, IAL-RC22, IAL-RC29-36, IAL-RC43 e IAL-RC59 foram detectadas em pacientes apresentando gastroenterite aguda proveniente da vigilância nacional dos RV entre Junho de 2007 e Junho de 2012. As cepas IAL-RC24, IAL-RC26, IAL-RC27 e IAL-RC37 foram detectadas em pacientes apresentando gastroenterite aguda proveniente de um surto na cidade de Valentim Gentil, Estado de São Paulo, em 1993. A cepa IAL-RC76 foi detectada em um paciente apresentando gastroenterite aguda na cidade de São Paulo, Estado de São Paulo, em 1988. Sequências VP7 de referência foram obtidas a partir do *GenBank*.....247

Figura 54. Árvore genealógica do tipo *Neighbor-Joining* (NJ) das sequências de aminoácidos deduzidas a partir das sequências nucleotídicas parciais do gene VP7 de RVC das cepas IAL-RC gerada com o software MEGA 4.0. As cepas IAL-RC foram detectadas nos anos de 1988, 1993 e 2007/2008 em pacientes apresentando sintomas de gastroenterite aguda provenientes da vigilância nacional dos RV (retângulos vermelhos). Sequências RVC VP7 de referência foram obtidas a partir do *GenBank*. G1 a G6 e G8 representam os genótipos identificados. As espécies e os números de acesso de cada cepa estão indicados. As siglas dos países de cada cepa estão descritas no Anexo 1. A escala indica a diversidade genética. Percentuais dos valores de *bootstrap* estão localizados nos nós dos ramos.....248

Figura 55. Matriz de identidade das sequências nucleotídicas parciais do gene VP4 de RVC gerada com o software *BioEdit* (Ibis Therapeutics, EUA). As cepas IAL-RC09, IAL-

RC12, IAL-RC22, IAL-RC30, IAL-RC31, IAL-RC33, IAL-RC34, IAL-RC36, IAL-RC43 e IAL-RC59 foram detectadas em pacientes apresentando gastroenterite aguda proveniente da vigilância nacional dos RV entre Junho de 2007 e Junho de 2012. As cepas IAL-RC26 e IAL-RC27 foram detectadas em pacientes apresentando gastroenterite aguda proveniente de um surto na cidade de Valentim Gentil, Estado de São Paulo, em 1993. Sequências VP4 de referência foram obtidas a partir do *GenBank*.....253

Figura 56. Árvore genealógica do tipo *Neighbor-Joining* (NJ) das sequências nucleotídicas parciais do gene VP4 de RVC das cepas IAL-RC gerada com o software MEGA 4.0. As cepas IAL-RC foram detectadas nos anos de 1993 e 2007/2008 em pacientes apresentando sintomas de gastroenterite aguda provenientes da vigilância nacional dos RV (retângulos vermelhos). Os retângulos verdes destacam as cepas de RVC com maior percentual de similaridade em relação às cepas IAL-RC. Sequências RVC VP4 de referência foram obtidas a partir do *GenBank*. P[1] a P[3] representam os genótipos identificados. J e L representam dois grupos geneticamente diferentes. As espécies e os números de acesso de cada cepa estão indicados. As siglas dos países de cada cepa estão descritas no Anexo 1. A escala indica a diversidade genética. Percentuais dos valores de *bootstrap* estão localizados nos nós dos ramos.....254

Figura 57. Alinhamento da sequência de aminoácidos deduzida a partir da sequência de nucleotídeos do gene VP4 de RVC entre as cepas IAL-RC09, IAL-RC12, IAL-RC22, IAL-RC26, IAL-RC27, IAL-RC30, IAL-RC31, IAL-RC33, IAL-RC34, IAL-RC36, IAL-RC43 e IAL-RC59 e as cepas protótipos. Os resíduos de lisina (k) localizados nos aminoácidos 231, 239, 244, 247 e 248 estão indicados por asteriscos. O domínio de clivagem está indicado pelo retângulo preto. Os retângulos vermelhos indicam a localização das deleções observadas nas cepas de RVC VP4 animais. As abreviações referentes aos aminoácidos estão listadas no Anexo 2.....257

Figura 58. Matriz de identidade das sequências deduzidas de aminoácidos a partir das sequências nucleotídicas parciais do gene VP4 de RVC gerada com o software *BioEdit*

(Ibis Therapeutics, EUA). As cepas IAL-RC09, IAL-RC12, IAL-RC22, IAL-RC30, IAL-RC31, IAL-RC33, IAL-RC34, IAL-RC36, IAL-RC43 e IAL-RC59 foram detectadas em pacientes apresentando gastroenterite aguda proveniente da vigilância nacional dos RV entre Junho de 2007 e Junho de 2012. As cepas IAL-RC26 e IAL-RC27 foram detectadas em pacientes apresentando gastroenterite aguda proveniente de um surto na cidade de Valentim Gentil, Estado de São Paulo, em 1993. Sequências VP4 de referência foram obtidas a partir do *GenBank*.....258

Figura 59. Árvore genealógica do tipo *Neighbor-Joining* (NJ) das sequências de aminoácidos deduzidas a partir das sequências nucleotídicas parciais do gene VP4 de RVC das cepas IAL-RC gerada com o software MEGA 4.0. As cepas IAL-RC foram detectadas nos anos de 1993 e 2007/2008 em pacientes apresentando sintomas de gastroenterite aguda provenientes da vigilância nacional dos RV (retângulos vermelhos) apresentando sintomas de gastroenterite aguda provenientes da vigilância nacional dos RV (retângulos vermelhos). Os retângulos verdes destacam as cepas de RVC com maior percentual de similaridade em relação às cepas IAL-RC. Sequências RVC VP4 de referência foram obtidas a partir do *GenBank*. P[1] a P[3] representam os genótipos identificados. As espécies e os números de acesso de cada cepa estão indicados. As siglas dos países de cada cepa estão descritas no Anexo 1. A escala indica a diversidade genética. Percentuais dos valores de *bootstrap* estão localizados nos nós dos ramos.....259

Figura 60. Matriz de identidade das sequências nucleotídicas parciais do gene NSP4 de RVC gerada com o software *BioEdit* (Ibis Therapeutics, EUA). As cepas IAL-RC01, IAL-RC09, IAL-RC12, IAL-RC22, IAL-RC30-36, IAL-RC43 e IAL-RC59 foram detectadas em pacientes apresentando gastroenterite aguda proveniente da vigilância nacional dos RV entre Junho de 2007 e Junho de 2012. As cepas IAL-RC26 e IAL-RC27 foram detectadas em pacientes apresentando gastroenterite aguda proveniente de um surto na cidade de Valentim Gentil, Estado de São Paulo, em 1993. Sequências NSP4 de referência foram obtidas a partir do *GenBank*.....264

Figura 61. Árvore genealógica do tipo *Neighbor-Joining* (NJ) das sequências nucleotídicas parciais do gene NSP4 de RVC das cepas IAL-RC gerada com o software MEGA 4.0. As cepas IAL-RC foram detectadas nos anos de 1993 e 2007/2008 em pacientes apresentando sintomas de gastroenterite aguda provenientes da vigilância nacional dos RV (retângulos vermelhos). Os retângulos verdes destacam as cepas de RVC com maior percentual de similaridade em relação às cepas IAL-RC. Sequências RVC NSP4 de referência foram obtidas a partir do *GenBank*. E1 a E3 representam os genótipos identificados. M e N representam dois grupos geneticamente diferentes. I e II representam dois subgrupos geneticamente distintos. As espécies e os números de acesso de cada cepa estão indicados. As siglas dos países de cada cepa estão descritas no Anexo 1. A escala indica a diversidade genética. Percentuais dos valores de *bootstrap* estão localizados nos nós dos ramos.....265

Figura 62. Alinhamento da sequência de aminoácidos deduzida a partir da sequência de nucleotídeos do gene NSP4 de RVC entre as cepas IAL-RC01, IAL-RC09, IAL-RC12, IAL-RC22, IAL-RC26, IAL-RC27, IAL-RC30-36, IAL-RC43 e IAL-RC59 e as cepas protótipos. Os domínios hidrofóbicos H2 e H3 estão indicados. Os cinco sítios de glicosilação N localizados nos aminoácidos 5-7 (NQT), 32-34 (NGS), 65-67 (NNS), 70-72 (NTT) e 134-136 (NDT) estão indicados por asteriscos. As abreviações referentes aos aminoácidos estão listadas no Anexo 2.....266

Figura 63. Matriz de identidade das sequências deduzidas de aminoácidos a partir das sequências nucleotídicas parciais do gene NSP4 de RVC gerada com o software *BioEdit* (Ibis Therapeutics, EUA). As cepas IAL-RC01, IAL-RC09, IAL-RC12, IAL-RC22, IAL-RC30-36, IAL-RC43 e IAL-RC59 foram detectadas em pacientes apresentando gastroenterite aguda proveniente da vigilância nacional dos RV entre Junho de 2007 e Junho de 2011. As cepas IAL-RC26 e IAL-RC27 foram detectadas em pacientes apresentando gastroenterite aguda proveniente de um surto na cidade de Valentim Gentil, Estado de São Paulo, em 1993. Sequências NSP4 de referência foram obtidas a partir do *GenBank*.....267

Figura 64. Árvore genealógica do tipo *Neighbor-Joining* (NJ) das sequências de aminoácidos deduzidas a partir das sequências nucleotídicas parciais do gene NSP4 de RVC das cepas IAL-RC gerada com o software MEGA 4.0. As cepas IAL-RC foram detectadas nos anos de 1993 e 2007/2008 em pacientes apresentando sintomas de gastroenterite aguda provenientes da vigilância nacional dos RV (retângulos vermelhos). Os retângulos verdes destacam as cepas de RVC com maior percentual de similaridade em relação às cepas IAL-RC. Sequências RVC NSP4 de referência foram obtidas a partir do *GenBank*. E1 a E3 representam os genótipos identificados. M e N representam dois grupos geneticamente diferentes. I e II representam dois subgrupos geneticamente distintos. As espécies e os números de acesso de cada cepa estão indicados. As siglas dos países de cada cepa estão descritas no Anexo 1. A escala indica a diversidade genética. Percentuais dos valores de *bootstrap* estão localizados nos nós dos ramos.....268

ÍNDICE DE TABELAS

- Tabela 1.** Segmentos genômicos dos RV, as proteínas virais codificadas e suas respectivas funções.....61
- Tabela 2.** Classificação dos genótipos dos 11 segmentos de RNA_{df} de RVA de acordo com o percentual de identidade nucleotídica (*cut-off*).....84
- Tabela 3.** Resumo da distribuição das cepas de RVA que comumente infectam animais.....97
- Tabela 4.** Sequência de nucleotídeos dos primers utilizados na caracterização de genótipos G da proteína VP7 dos RVA, suas respectivas posições de anelamento, amostra usada como protótipo e referencia bibliográfica.....137
- Tabela 5.** Sequência de nucleotídeos dos primers utilizados na caracterização de genótipos P da proteína VP4 dos RVA, suas respectivas posições de anelamento, amostra usada como protótipo e referencia bibliográfica.....138
- Tabela 6.** Tamanho dos segmentos produzidos pela RT-PCR (1^o amplificação) para os genes que codificam as proteínas VP7 e VP4 e dos segmentos produzidos pela *semi-nested multiplex* PCR (2^o amplificação) para cada um dos genótipos G e P de RVA testados com seus respectivos primers.....144
- Tabela 7.** Sequência de nucleotídeos dos primers utilizados na caracterização molecular das proteínas VP4, VP6, VP7 e NSP4 dos RVC, suas respectivas posições de anelamento e referencia bibliográfica.....148
- Tabela 8.** Tamanho dos segmentos produzidos pelas reações de RT-PCR e *semi-nested* PCR para cada uma das proteínas de RVC testadas e seus respectivos primers.....149

Tabela 9. Distribuição das amostras positivas para RVA de acordo com a faixa etária nas regiões Sul, Sudeste e Centr-Oeste do Brasil durante a vigilância nacional dos RV no período compreendido entre Junho de 2007 e Junho de 2012.....	159
Tabela 10. Distribuição dos genótipos G identificados nas amostras positivas para RVA coletadas nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil durante a vigilância nacional dos RV no período compreendido entre Junho de 2007 e Junho de 2012....	161
Tabela 11. Distribuição dos genótipos P identificados nas amostras positivas para RVA coletadas nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil durante a vigilância nacional dos RV no período compreendido entre Junho de 2007 e Junho de 2012....	162
Tabela 12. Distribuição da combinação de genótipos G e P identificados nas amostras positivas para RVA coletadas nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil durante a vigilância nacional dos RV no período compreendido entre Junho de 2007 e Junho de 2012.....	164
Tabela 13. Dados sócios demográficos e moleculares dos pacientes positivos para RVA que apresentavam combinações atípicas G e P detectados durante o período de Junho de 2007 a Junho de 2012.....	166
Tabela 14. Dados sócios demográficos dos pacientes com gastroenterite aguda positivos para RVC detectados nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil durante a vigilância nacional dos RV no período compreendido entre Junho de 2007 e Junho de 2012.....	214
Tabela 15. Dados sócios demográficos dos pacientes com gastroenterite aguda positivos para RVC previamente detectadas pelo NDE.....	215
Tabela 16. Cepas positivas para RVC amplificadas por RT-PCR ou <i>nested</i> RT-PCR e utilizadas na caracterização molecular da proteína VP6.....	217

Tabela 17. Cepas positivas para RVC amplificadas por RT-PCR ou *nested* RT-PCR e utilizadas na caracterização molecular da proteína VP7.....218

Tabela 18. Cepas positivas para RVC amplificadas por RT-PCR e utilizadas na caracterização molecular da proteína VP4.....219

Tabela 19. Cepas positivas para RVC amplificadas por RT-PCR e utilizadas na caracterização molecular da proteína NSP4.....220

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	50
1.1 Histórico.....	53
1.2 Estrutura dos Rotavírus.....	55
1.3 Organização do Genoma.....	62
1.4 Características Físico-Químicas.....	68
1.5 Replicação viral.....	68
1.6 Patogênese.....	72
1.7 Classificação dos rotavírus.....	76
1.8 Rotavírus do grupo A.....	77
1.8.1 Classificação dos rotavírus do grupo A.....	78
1.8.1.1 Genogrupos de rotavírus grupo A.....	78
1.8.1.2 Subgrupos de rotavírus grupo A.....	79
1.8.1.3 Perfil eletroforético dos rotavírus do grupo A.....	79
1.8.1.4 Sistema binário de classificação dos rotavírus do grupo A.....	80
1.8.1.5 Nomenclatura dos rotavírus do grupo A.....	82
1.8.1.6 Sistema de classificação do genoma completo de rotavirus do grupo A: constelação de genótipos.....	83
1.8.2 Imunidade contra rotavírus do grupo A.....	85
1.8.3 Diagnóstico dos rotavírus do grupo A.....	89
1.8.4 Epidemiologia dos rotavírus do grupo A.....	90
1.8.5 Distribuição das cepas de rotavírus do grupo A.....	93
1.8.6 Manifestações clínicas do rotavírus do grupo A.....	97
1.8.7 Prevenção contra infecção por rotavírus do grupo A.....	100
1.8.7.1 Vacinas contra rotavírus do grupo A.....	101
1.8.8 Transmissão do rotavírus do grupo A.....	104
1.8.8.1 Transmissão interespécie e potencial zoonótico do rotavírus do grupo A.....	105
1.8.9 Diversidade genética e evolução dos rotavírus do grupo A.....	107

1.9 Rotavírus do grupo C.....	111
1.9.1 Classificação dos rotavírus do grupo C.....	111
1.9.1.1 Subgrupos de rotavírus grupo C.....	111
1.9.1.2 Perfil eletroforético dos rotavírus do grupo C.....	112
1.9.1.3 Sistema Binário de Classificação dos Rotavírus.....	112
1.9.1.4 Sistema de classificação do genoma completo de rotavirus do grupo C: constelação de genótipos.....	113
1.9.2 Imunidade contra rotavírus do grupo C.....	114
1.9.3 Diagnóstico dos rotavírus do grupo C.....	115
1.9.4 Epidemiologia dos rotavírus do grupo C.....	116
1.9.5 Distribuição das cepas de rotavírus do grupo C.....	119
1.9.6 Manifestações clínicas dos rotavírus do grupo C.....	120
1.9.7 Prevenção contra infecção por rotavírus do grupo C.....	121
1.9.8 Transmissão do rotavírus do grupo C.....	121
1.9.8.1 Transmissão interespécie e potencial zoonótico do rotavírus do grupo C.....	121
1.9.9 Diversidade genética e evolução dos rotavírus do grupo C.....	123
2. OBJETIVOS.....	126
2.1 Objetivo Geral.....	126
2.2 Objetivos Específicos.....	126
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	129
3.1 Amostragem.....	129
3.2 Preparo da suspensão de fezes.....	130
3.3 Ensaio imunoenzimático para rotavírus do grupo A (EIA ou ELISA).....	131
3.4 Eletroforese de RNAdf de rotavírus em gel de poliacrilamida (EGPA ou SDS- PAGE).....	132
3.4.1 Extração do ácido nucléico viral (RNAdf).....	133
3.4.2 Preparo do gel de poliacrilamida.....	133

3.4.3	Preparo das amostras para corrida gel de poliacrilamida.....	134
3.4.4	Corrida eletroforética em gel de poliacrilamida.....	134
3.4.5	Coloração do gel de poliacrilamida.....	134
3.4.6	Secagem do gel de poliacrilamida.....	135
3.4.7	Foto-documentação do gel de poliacrilamida.....	135
3.4.8	Interpretação dos resultados de eletroforese em gel de poliacrilamida.....	136
3.5	Transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase e subsequente re-amplificação com iniciadores (primers) múltiplos (<i>semi-nested multiplex</i> RT-PCR) para rotavírus do grupo A.....	136
3.5.1	Extração do ácido nucléico viral (RNA _{df}).....	138
3.5.1.1	Extração do ácido nucléico viral com TRIZOL [®] Reagent.....	138
3.5.1.2	Extração do ácido nucléico viral com QIAamp [®] Viral RNA Mini Kit.....	139
3.5.2	Desnaturação do ácido nucléico.....	140
3.5.3	RT-PCR: primeira amplificação dos genes que codificam para as proteínas VP7 e VP4.....	140
3.5.4	RT-PCR: segunda amplificação a partir do produto da RT-PCR obtida na primeira amplificação dos genes que codificam para as proteínas VP7 e VP4 (Genotipagem).....	141
3.5.5	Eletroforese em gel de agarose.....	142
3.5.6	Foto-documentação do gel de agarose.....	143
3.5.7	Interpretação dos resultados.....	143
3.6	Transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (<i>one step</i> RT-PCR) e subsequente re-amplificação (<i>semi-nested</i> RT-PCR) para rotavírus do grupo C.....	147
3.6.1	Extração do ácido nucléico viral com QIAamp [®] Viral RNA Mini Kit.....	149
3.6.2	Desnaturação do ácido nucléico.....	149
3.6.3	RT-PCR: primeira amplificação para as proteínas VP4, VP6, VP7 e NSP4.....	149
3.6.4	RT-PCR: segunda amplificação a partir do produto da RT-PCR obtida na primeira amplificação dos genes que codificam para as proteínas VP6 e VP7.....	150

3.6.5 Eletroforese em gel de agarose.....	151
3.6.6 Foto-documentação do gel de agarose.....	151
3.6.7 Interpretação dos resultados.....	151
3.7 Sequenciamento genômico.....	151
3.7.1 Purificação do produto de PCR.....	152
3.7.2 Quantificação do cDNA resultante da purificação do produto da PCR.....	153
3.7.3 Reação de sequenciamento.....	153
3.7.4 Purificação e precipitação do produto da reação de seqüenciamento.....	154
3.7.5 Análise molecular das sequências.....	154
3.7.6 Números de Acesso.....	155
3.8 Biossegurança.....	155
4. RESULTADOS.....	158
4.1 Rotavirus do grupo A.....	158
4.1.1 Triagem das amostras para rotavírus grupo A.....	158
4.1.2 Análise do perfil eletroforético das amostras positivas para rotavírus grupo A...159	159
4.1.3 Diversidade genotípica G e P das amostras positivas para rotavírus grupo A...159	159
4.1.3.1 Genótipos G.....	159
4.1.3.2 Genótipos P.....	161
4.1.3.3 Associação de genótipos G e P.....	162
4.1.3.4 Detecção de genótipos G e P atípicos.....	165
4.1.4 Descrição e identificação das amostras positivas para rotavírus grupo A com genótipos e/ou combinações atípicas com suposta origem animal.....	165
4.1.5 Sequenciamento genômico de cepas de rotavírus do grupo A com genótipo G8P[6].....	168
4.1.5.1 Genótipo G8.....	169
4.1.5.2 Genótipo P[6].....	178
4.1.6 Sequenciamento genômico de cepa de rotavírus do grupo A com genótipo G3P[3].....	187
4.1.6.1 Genótipo G3.....	187

4.1.6.2 Genótipo P[3].....	196
4.1.7 Sequenciamento genômico de cepa de rotavírus do grupo A com genótipo G10P[?].....	205
4.1.7.1 Genótipo G10.....	205
4.2 Rotavírus do grupo C.....	214
4.2.1 Triagem das amostras para rotavírus grupo C.....	214
4.2.2 Amostras positivas para rotavírus grupo C previamente detectadas pelo NDE.....	215
4.2.3 Reação de RT-PCR das amostras positivas para rotavírus grupo C	215
4.2.3.1 Proteína VP6 – Gene 5.....	215
4.2.3.2 Proteína VP7 – Gene 8.....	216
4.2.3.3 Proteína VP4 – Gene 3.....	216
4.2.3.4 Proteína NSP4 – Gene 11.....	216
4.2.4 Sequenciamento genômico das amostras positivas para rotavírus do grupo C.....	221
4.2.4.1 Proteína VP6 – Gene 5.....	221
4.2.4.2 Proteína VP7 – Gene 8.....	236
4.2.4.3 Proteína VP4 – Gene 3.....	249
4.2.4.4 Proteína NSP4 – Gene 11.....	260
5. DISCUSSÃO.....	270
5.1 Rotavírus do grupo A.....	270
5.1.1 Vigilância laboratorial dos RVA.....	270
5.1.2 Genótipo G8P[6].....	278
5.1.3 Genótipo G3P[3].....	284
5.1.4 Genótipo G10P[?].....	290
5.2 Rotavírus do grupo C.....	295
6. CONCLUSÕES.....	309

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS312

ANEXOS

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A doença diarreica aguda (DDA) é uma síndrome causada por diferentes agentes etiológicos (bactérias, vírus e parasitas), cuja manifestação predominante é o aumento do número de evacuações, com fezes aquosas ou de pouca consistência (Waldman et al., 1997). A DDA ou gastroenterite é a doença mais comum em todo o mundo (Kapikian et al., 2001) e a principal causa de mortalidade entre crianças menores de 5 anos de idade (Black et al., 2010). A DDA afeta de maneira desproporcional as crianças que habitam países de baixa e média renda, as quais exibem uma taxa de incidência maior devido, principalmente, à má qualidade da água potável, saneamento inadequado e fatores de risco nutricionais, como a amamentação sub-ótima e a deficiência de zinco e vitamina A (Beaton et al., 1993; Brown et al., 2009; Lamberti et al., 2011).

Durante Cúpula do Milênio da Organização das Nações Unidas (ONU) ocorrida em 2000, os líderes mundiais dos países desenvolvidos e em desenvolvimento se comprometeram a cumprir um conjunto de oito metas (*Millennium Development Goals* – MDG), visando acabar com a pobreza extrema no mundo até 2015 (<http://www.endpoverty2015.org/en/goals>). O cumprimento das metas MDG 1 “*Erradicar a pobreza extrema e a fome*”, MDG 4 “*Reduzir a mortalidade infantil*” e MDG 7 “*Garantir a sustentabilidade ambiental*” diminuirá drasticamente a incidência de DDA.

Tendo em vista o cumprimento das MDGs, atualizações sobre a mortalidade total em crianças <5 anos são publicadas todos os anos, sendo a estimativa mais recente datada de 2008 (Black et al., 2010). O número de mortes devido a DDA em crianças dessa faixa etária estimado para 2008 foi de 1.336.289 milhões, sendo que o Brasil responsável por 3.543 mil mortes (Black et al., 2010). A taxa de incidência da DDA diminuiu, partindo de 3,4 episódios/ano em 1990 para 2,9 episódios/ano em 2010; sendo esta redução fortemente correlacionada com o declínio geral das taxas de mortalidade observadas para o mesmo grupo (Fischer Walker et al., 2012).

No Brasil, um país de dimensões continentais e com grande heterogeneidade socioeconômica, os dados do monitoramento das DDA entre os anos de 2000 e 2011 contabilizaram um total de 33.397.413 de casos notificados (<http://portal.saude.gov.br>).

Diversos estudos documentam de forma evidente a diminuição significativa das taxas de morbidade e mortalidade associadas à DDA, em acordo com os dados mundiais (Victora et al., 1996; Barros et al., 2010; do Carmo et al., 2011).

Como citado anteriormente, a gastroenterite em crianças pode ser causada por uma gama de enteropatógenos; entretanto a DDA é mais comumente associada ao rotavírus (RV). Este patógeno viral foi descrito há menos de 40 anos e, rapidamente, foi reconhecido como a principal causa de mortalidade e morbidade associada à diarreia (Kang, 2006). Virtualmente, toda criança no mundo, tanto nos países desenvolvidos quanto em desenvolvimento, será infectada por RV nos primeiros 5 anos de idade (Lanzieri et al., 2011). No mundo, a DDA causada por RV é responsável por 1/3 das 1.34 milhões de mortes e por 9 milhões de internações hospitalares entre crianças <5 anos (Parashar et al., 2009; Black et al., 2010).

Em 2006, o Brasil foi um dos primeiros países da América Latina a realizar a vacinação contra RV, juntamente com El Salvador, México, Nicarágua, Panamá e Venezuela (CDC, 2011). Antes da introdução dessa vacina no Programa Nacional de Imunização (PNI), a infecção por RV causava a cada ano cerca de 3,5 milhões de episódios de diarreia, 655.853 mil visitas ambulatoriais, 92.453 mil hospitalizações e 850 mortes em crianças <5 anos (Sartori et al., 2008). Um estudo conduzido por do Carmo et al. (2011) monitorou a DDA por um período de três anos após a introdução da vacina contra o RV no Brasil (2007 a 2009). A cobertura vacinal estimada entre 2007 e 2009 variou de 80% a 84% para crianças que receberam duas doses de vacina contra RV. Este estudo evidenciou uma redução de ~1.500 mortes associadas a DDA e menos de 130.000 mil admissões hospitalares em crianças <5 anos (do Carmo et al., 2011).

Frente a esses resultados promissores no Brasil e em outros países, em julho de 2009, a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomendou a introdução de vacinas contra RV nos PNIs de todos os países do mundo, a fim de se controlar a DDA causada por esse patógeno, principalmente em países onde a DDA é responsável por >10% das mortes em crianças <5 anos (WHO, 2009). Em Junho de 2011, a vacina contra RV foi incluída nos PNIs de 14 (44%) dos 32 países que compõem a América Latina e Caribe (CDC, 2011). A vacinação será introduzida nos países africanos e

asiáticos nos próximos 3-5 anos. Um total de 16 países, sendo 12 na África e 4 na Ásia, incluirá a vacina em 2012 e 2013 devido a um plano de financiamento assegurado pela GAVI Alliance (*Global Alliance for Vaccines and Immunization*) (CDC, 2011).

Entretanto, especula-se que essas vacinas disponíveis comercialmente terão de enfrentar um grande desafio, pois são compostas por vírus geneticamente estáveis (fixos) que se replicam com dificuldade em humanos e têm o dever de atuarem contra RV geneticamente diversos, evolutivamente dinâmicos e que podem ser eliminados para o ambiente em títulos elevados por uma criança doente. Do ponto de vista molecular, será um feito notável as cepas vacinais conseguirem manter o domínio sobre um cenário tão diverso, evitando o aparecimento de novas cepas (Patton, 2012).

O RV também configura como principal agente viral associado à gastroenterite em animais, sendo isolado em diversas espécies de mamíferos domésticos e selvagens, incluindo mamíferos aquáticos e alados (Dunn et al., 1994; Ciarlet et al., 1995; Ciarlet et al., 1997a; Lee et al., 2003; Elschner et al., 2005b; Coria-Galindo et al., 2009; Abe et al., 2010; Esona et al., 2010a; Badaracco et al., 2012; Gazal et al., 2012; Tupler et al., 2012), além das aves (Elschner et al., 2005a; Asano et al., 2011; Silva et al., 2012). Pesquisas sobre a prevalência de anticorpos contra RV em animais de zoológico e em mamíferos selvagens capturados revelaram soropositividade em uma grande gama de animais, indicando a susceptibilidade generalizada à infecção por RV (Petric et al., 1981; Baumeister et al., 1983; Puntel et al., 1999; Coria-Galindo et al., 2009; Abe et al., 2010).

A infecção por RV é considerada a principal causa de diarreia em novilhos no mundo (Saif et al., 1994; Martella et al., 2010) e é o agente viral mais comumente associado à diarreia em leitões (Kapikian e Chanock, 1996) e potros (Conner e Darligton, 1980). Essas infecções geram perdas econômicas importantes entre criações de bovinos, suínos e equinos, devido aos custos com o tratamento e a perda de peso dos animais afetados (Saif e Fernandez, 1996; Martella et al., 2010). No mercado, existem diversas vacinas contra RV comercialmente disponíveis para esses três grupos de animais há vários anos (Martella et al., 2010).

De modo interessante, o RV não está entre os principais patógenos entéricos

que acometem cães e gatos, sendo detectados em baixa frequência tanto em animais sintomáticos quanto assintomáticos (Marshall et al., 1987; Ruiz et al., 2009b). Os RV identificados em aves parecem ser geneticamente heterogêneos e, salvo raras exceções (Asano et al., 2011), não estão relacionados aos RV isolados em mamíferos (Ito et al., 2001; Matthijnsens et al., 2008b).

Evidências de transmissão interespecie e de rearranjos entre RV humanos e animais vêm se acumulando na literatura (Gabbay et al., 2008; Esona et al., 2010a). Algumas espécies em particular, cães, gatos, porcos e bois, parecem contribuir de maneira mais incisiva e frequente para a diversidade genética encontrada em humanos (Martella et al., 2011). Acredita-se que essa frequência seja devida às interações próximas entre os humanos e esses animais, resultante de forças econômicas e culturais. As cepas mistas de RV (com genoma derivado de RV humano e animal) parecem ter maior sucesso evolutivo na população humana quando comparadas às cepas heterólogas (com genoma exclusivamente animal). Atualmente, existe a preocupação se a recente introdução de vacinas contra o RV em crianças poderia alterar as forças e o equilíbrio que regem a evolução dos RV nas diferentes espécies animais (Martella et al., 2010).

1.1 Histórico

A primeira evidência da participação dos RV em gastroenterites ocorreu ao se reproduzir experimentalmente um quadro de diarreia em bezerros saudáveis utilizando filtrado de material fecal (livre de bactérias) proveniente de animais doentes. Essas partículas virais observadas por microscopia eletrônica no material fecal oriundo dos bezerros foram denominadas *Nebraska Calf Diarrhea Virus* (NCDV) (Lu et al., 1995). White et al. (1970) relatou a presença desse mesmo vírus em surtos de diarreia entre bovinos, enquanto Welch (1971) e Fernelius et al. (1972) verificaram a analogia do NCDV com partículas semelhantes a reovírus (*Reovirus-like particles*), renomeando-o como *Neonatal Calf Diarrhea Reovirus-like* (NCDR).

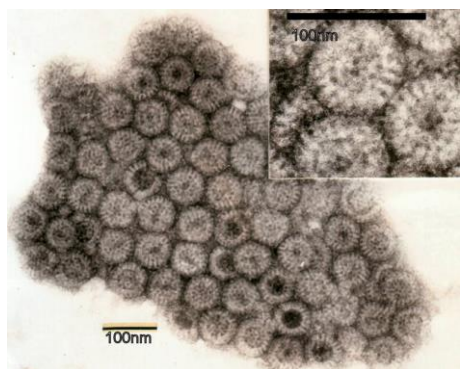
Nos humanos, Bishop et al. (1973) identificou partículas virais de aproximadamente 70nm utilizando microscópio eletrônico em cortes histológicos de

mucosa duodenal associadas a um quadro de diarreia aguda em crianças. Ainda em 1973, Flewett et al. (1974b) identificou, através de microscopia eletrônica, partículas virais semelhantes a reovírus em amostras fecais de crianças com diarreia.

Flewett et al. (1974a) verificou que as partículas virais presentes em material fecal de crianças com gastroenterite aguda e de bezerros com quadro clínico de diarreia eram morfologicamente idênticas quando observadas por microscopia eletrônica. Baseando-se na identidade antigênica apresentada por essas partículas semelhantes à reovírus nas reações de imunofluorescência e imunomicroscopia eletrônica, realizadas em soro de crianças convalescentes e na sua morfologia similar a roda (em latim “*rota*”) foi proposta a denominação de *Rotavirus* (Figura 1).

Após essas descobertas iniciais, em um curto período de tempo, inúmeros estudos em diversos países relataram a identificação de *Reovirus-like particles* ou *rotavirus* em amostras fecais de crianças com quadro clínico de gastroenterite aguda (Cruickshank et al., 1974; Holmes et al., 1974; Kapikian et al., 1974). Em 1978, o Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus (ICTV – *International Committee on Taxonomy of Viruses*) incluiu pela primeira vez o gênero *Rotavirus* na família *Reoviridae*, classificação esta, mantida até hoje (Matthews, 1979).

No Brasil, os primeiros relatos da presença de RV em humanos ocorreram no final da década de 70, sendo identificado por microscopia eletrônica e contraímunoeletroforese em amostras fecais de crianças com diarreia (Linhares et al., 1977; Candeias et al., 1978).



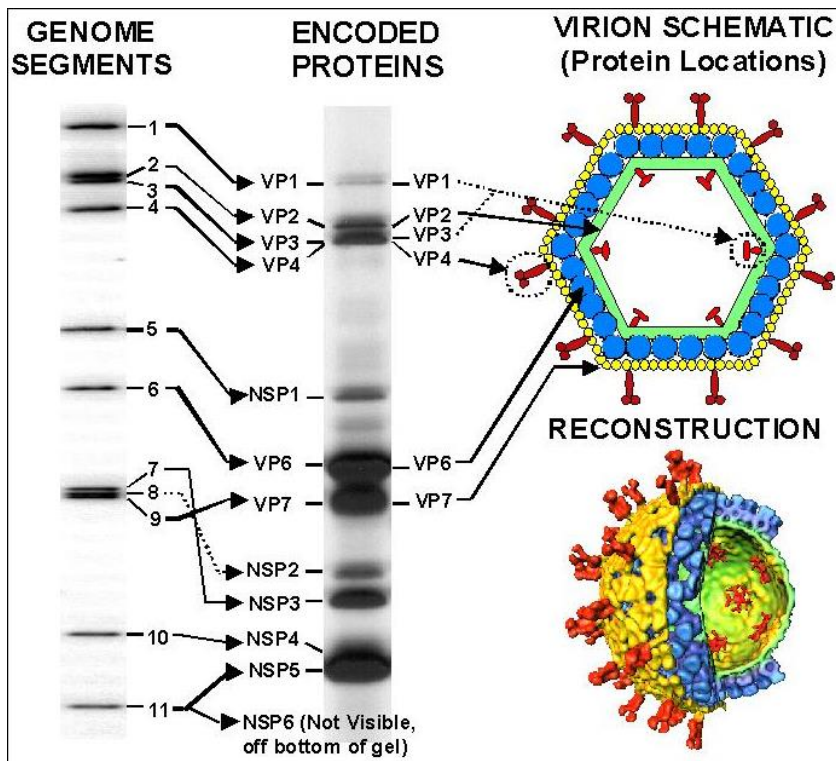
Fonte: http://en.wikipedia.org/wiki/File:Group_C_Rotavirus.jpg

Figura 1. Partículas de RV observadas ao microscópio eletrônico. A barra representa 100 nm (1.000 Å).

1.2 Estrutura dos Rotavírus

Os RV pertencem ao gênero *Rotavirus* e à família *Reoviridae*. As partículas virais íntegras dos RV são esféricas, apresentam aproximadamente 70-100nm de diâmetro, possuem capsídeo com simetria icosaédrica e sem envoltório. O capsídeo é formado por três camadas proteicas: capsídeo interno, intermediário e externo. O capsídeo externo apresenta 60 espículas distribuídas em sua superfície e sua integridade é dependente da presença de cálcio. O capsídeo interno ou core contém o genoma viral e apresenta um diâmetro de aproximadamente 37nm (Estes, 2001; Estes e Kapikian, 2007; Greenberg e Estes, 2009).

O genoma viral é constituído por 11 segmentos de RNA de fita dupla (RNAdf) com pesos moleculares que variam de 663 a 3.302 pares de bases (pb). No total o genoma dos RV possui 18.550pb (Fauquet et al., 2007). Cada segmento codifica para uma proteína viral específica, sendo 6 proteínas estruturais, denominadas VP (*viral protein* – VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 e VP7), e 6 proteínas não estruturais denominadas NSP (*non structural protein* – NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5, NSP6). Os segmentos do RV são monocistrômicos, com exceção do segmento 11, o qual codifica para duas proteínas (NSP5 e NSP6) (Ramig, 2004; Estes e Kapikian, 2007; Matthijnssens et al., 2008b) (Figura 2). O RNAdf viral não é infectivo sem a presença das proteínas do capsídeo externo (Estes e Kapikian, 2007).



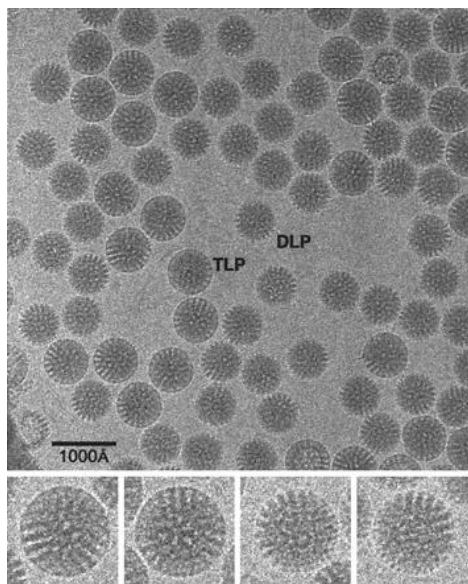
Fonte: http://www.reoviridae.org/dsRNA_virus_proteins/rotavirus%20figure.htm

Figura 2. Representação esquemática da estrutura da partícula de RV símio (SA11). A figura mostra a correspondência entre os segmentos de RNA_{df} (a esquerda), o diagrama esquemático (a direita no alto) e a estrutura tridimensional do vírus por criomicroscopia (a direita abaixo).

A estrutura tridimensional dos RV tem sido revelada por criomicroscopia eletrônica associada a programas de computador que realizam processamento de imagens (Dormitzer et al., 2004). Esses estudos elucidam quais as estruturas moleculares envolvidas nos mecanismos virais de adsorção, penetração, replicação, liberação e neutralização viral, contribuindo para o conhecimento dos aspectos funcionais dessas estruturas (Prasad e Chiu, 1994).

O fato de os RV serem formados por triplo-capsídeo implica na observação de três tipos diferentes de partículas em microscópio eletrônico. A partícula completa é infectiva e chamada de “partícula com tripla camada” (TLP – *triple-layered particle*). A partícula desprovida do capsídeo externo é chamada de “partícula com dupla camada” (DLP – *double-layered particle*). Na DLP é possível observar o capsídeo intermediário formado por trímeros da proteína estrutural VP6. A DLP também é chamada de

“partícula rugosa” devido às projeções proteicas do capsídeo interno. O terceiro tipo de partícula é formado exclusivamente pelo capsídeo interno sendo denominada “partícula de camada simples” (SLP – *single-layered particle*) e está associada ao genoma viral (Estes e Kapikian, 2007) (Figura 3).



Fonte: Baker et al., 1999

Figura 3. Crio-micrografia eletrônica de uma amostra fecal contendo partículas de RV com tripla e dupla camada (TLP e DLP). As TLPs são maiores e apresentam uma suave aparência circular, enquanto as DLPs são menores e exibem perfis pontiagudos. Os quadros na parte inferior da figura mostram imagens ampliadas de duas TLPs (à esquerda) e duas DLPs (à direita). A barra representa 100 nm (1.000 Å).

O core viral é formado pelas proteínas VP1, VP2 e VP3, codificadas respectivamente pelos segmentos 1, 2 e 3 de RNAdf. O core apresenta-se dividido em duas camadas: a proteína VP2 forma a camada que engloba o sub-core; e este é constituído pelas proteínas VP1 (enzima polimerase viral - *Pol*) e VP3 (enzimas guanilil-transferase e metil-transferase - *Cap*), as quais estão associadas ao genoma viral (Shaw et al., 1993; Prasad e Chiu, 1994). A proteína VP2 está organizada em 60 dímeros, medindo 51nm de diâmetro, 3,5nm de espessura e apresenta simetria icosaédrica T=2 (Venkataram et al., 2001). Este conjunto forma uma estrutura de 12 complexos enzimáticos diretamente ligados ao genoma viral (Shaw et al., 1993; Prasad

et al., 1996; Estes e Kapikian, 2007) (Tabela 1).

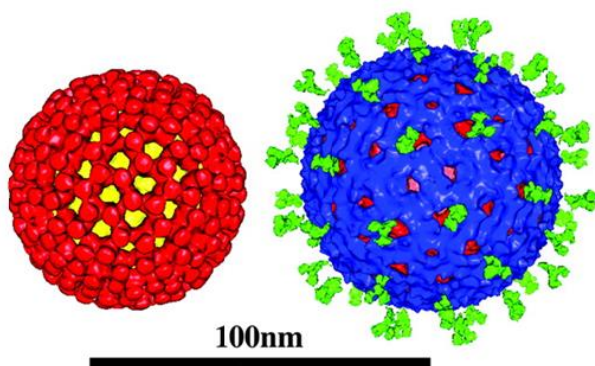
O core é envolvido pelo capsídeo intermediário composto por 780 moléculas de VP6 arranjada em 260 trímeros. A proteína VP6 é codificada pelo segmento 6 de RNAdf (Estes e Kapikian, 2007). Esta camada forma a parte externa das DLPs e mede ~70,5nm de diâmetro. A associação do capsídeo intermediário formado pela proteína VP6 com o core viral formado pela proteína VP2 confere à partícula maior homogeneidade morfológica e estabilidade em longo prazo. Acredita-se que a proteína VP6 seja a responsável pela integridade da partícula de RV (Zeng, 1994) (Tabela 1).

O capsídeo intermediário é envolvido pelo capsídeo externo, o qual é composto pelas proteínas VP7 e VP4, sendo que ambas exercem papel importante na infectividade viral. A VP7 é formada por 780 moléculas proteicas dispostas em 260 trímeros agrupados em pentâmeros ou hexâmeros que interagem com o ápice dos trímeros da VP6. A camada de VP7 apresenta um diâmetro de ~75nm. A VP7 é codificada pelos segmentos 7, 8 ou 9 do RNAdf dependendo da cepa viral e é indutora de anticorpos neutralizantes (Prasad e Chiu, 1994). Ainda, no capsídeo externo encontram-se 60 espículas compostas por dímeros de VP4 (Prasad et al., 1990). Essas espículas medem ~20nm, sendo que 12nm delas se projetam da superfície do capsídeo externo, conferindo à partícula dos RV um diâmetro total de 100nm (Shaw et al., 1993; Fauquet et al., 2007). Os 8nm restantes da espícula se estendem para o interior da partícula viral, interagindo com as proteínas VP7, VP6 e, muito provavelmente, com a VP2, sendo de vital importância para a manutenção de sua característica estrutura em triplo capsídeo (Dormitzer et al., 2004) (Figura 4, Tabela 1).

A proteína VP4 é sintetizada pelos segmentos 3 e 4 dependendo da cepa viral (Prasad e Chiu, 1994; Estes e Kapikian, 2007). Apesar de ser um componente em menor quantidade no capsídeo externo, desempenha funções importantes: está envolvida no processo de entrada do RV nas células hospedeiras, na indução de anticorpos neutralizantes, exibe atividade hemaglutinante (similar a proteínas de fusão celular) e funciona como sítio de ativação da infecciosidade através de clivagem proteolítica (Both et al., 1994; Prasad e Chiu, 1994; Estes e Kapikian, 2007). A clivagem proteolítica divide a VP4 em duas subunidades: VP5* e VP8*. A VP5* está associada à neutralização heterotípica, enquanto a VP8* esta associada à

neutralização homotípica (Estes e Kapikian, 2007) (Tabela 1).

A camada externa do RV é extremamente lábil, sendo sua estabilidade dependente de cálcio (Hoshino e Kapikian, 1994). A presença de íons cálcio é necessária para manter a integridade e infectividade da partícula viral (Estes e Cohen, 1989).



Fonte: Libersou et al., 2008

Figura 4. Reconstrução em 3-D de partículas de RV. As reconstruções em 3-D possuem uma resolução de ~2,5nm e mostram a estrutura em camadas das partículas virais. A reconstrução da esquerda representa uma DLP composta por duas camadas protéicas, sendo a interna formada pela proteína VP2 (em amarelo) e a externa formada pela proteína VP6 (em vermelho). A reconstrução da direita representa uma TLP composta por três camadas. O core (amarelo) não visível esta localizada dentro da camada intermediária formada pela proteína VP6 (vermelho). A camada mais externa é composta pelas proteínas VP7 (em azul) e VP4 (em verde). A barra representa 100 nm (1.000 Å).

A proteína NSP1 é codificada pelo segmento 5 e produzida logo no início da infecção viral. Acredita-se que esta proteína esteja envolvida na replicação do genoma viral (Estes e Kapikian, 2007). A proteína NSP2 possui atividade de replicase, interagindo com a RNA polimerase RNA-dependente. A NSP2 é codificada pelos segmentos genômicos 7, 8 ou 9, dependendo da cepa viral e também se associa a VP1 na formação do viroplasma, recebendo a denominação de matriz proteica do viroplasma (VIP) (Patton et al., 2006; Estes e Kapikian, 2007). A NSP3 é detectada em grande quantidade associada ao core durante os últimos estágios de montagem da partícula viral e liga-se a extremidade 3' do RNA mensageiro (RNAm) viral. Pode ser

codificada pelos segmentos 7, 8 ou 9 dependendo da amostra de RV (Estes e Kapikian, 2007) (Tabela 1).

A proteína NSP4 é codificada pelo segmento 10 e exerce papel importante na virulência, uma vez que exibe função de enterotoxina viral, indispensável à infecção. Durante a replicação viral, a NSP4 permanece como uma glicoproteína transmembrânica do Retículo Endoplasmático Rugoso (RER), exercendo papel importante na morfogênese viral, sendo sua glicosilação necessária para a montagem da partícula viral. Ao se ligar ao receptor celular do epitélio intestinal, a NSP4 promove a elevação dos níveis de cálcio, aumentando a permeabilidade da membrana plasmática e permitindo a secreção do cloreto, induzindo à diarreia (Huang et al., 2001; Estes e Kapikian, 2007) (Tabela 1).

Tabela 1. Segmentos genômicos dos RV, as proteínas virais codificadas e suas respectivas funções.

Segmento	Pares de base (pb)	Proteína	Localização	Função
1	3302	VP1 (<i>Pol</i>)	Core	RNA polimerase RNA-dependente
2	2690	VP2 (T2)	Core	Proteína ligante ao RNA
3	2591	VP3 (<i>Cap</i>)	Core	Guanil-transferase
4	2362	VP4	Capsídeo externo	Espícula de superfície
		VP5*		Antígeno de neutralização (P)
		VP8*		Proteína de adsorção á célula hospedeira
				Clivada por tripsina em VP5* e VP8*
				Responsável pela infectividade viral
5	1611	NSP1	Não estrutural	Componente do subcore
				Alta diversidade intraespecífica
				Possível papel como fator de virulência
6	1356	VP6 (T3)	Capsídeo intermediário	Proteína hidrofóbica
				Determina antígeno de grupo e subgrupo
7	1104	NSP3	Não estrutural	Associada ao citoesqueleto
				Atua de forma semelhante a proteína de ligação poli(A) celular
				Inibe a síntese de proteína celular
8	1059	NSP2 (VIP)	Não estrutural	Possível papel na replicação viral
				Associada à VP1
				Envolvida na formação do viroplasma
9	1062	VP7 (1)	Capsídeo externo	Antígeno de neutralização
		VP7 (2)		Sítio de ligação para íons cálcio
				Gene bicistrônico
10	751	NSP4	Não estrutural	Glicoproteína transmembrânica do RER
				Papel na morfogênese
				Enterotoxina
				Sítio de ligação para íons cálcio
11	667	NSP5	Não estrutural	

Segmento	Pares de base (pb)	Proteína	Localização	Função
11	667	NSP6	Não estrutural	Interage com NSP2 Sofre fosforilação Ligada ao RNAdf Gene bicistrônico Atua na formação do viroplasma Interage com NSP5 Sofre fosforilação Ligada ao RNAdf Gene bicistrônico

Fonte: Estes, 2001 modificada pelo autor

As proteínas NSP5 e NSP6 são codificadas pelo segmento 11. A NSP5 é uma proteína quinase que sofre fosforilação na célula infectada. Acredita-se que esteja envolvida com a replicação do genoma, montagem do core e interage com a NSP2 e a NSP6 no viroplasma (Estes e Kapikian, 2007). A NSP6 esta presente no viroplasma interagindo com a NSP5 (Estes e Kapikian, 2007) (Figura 2, Tabela 1).

1.3 Organização do Genoma

O genoma completo dos RV contem ~18.552pb com peso molecular de $2,0 \times 10^5$ a $2,0 \times 10^6$ Daltons (Estes e Kapikian, 2007). Os segmentos de RNAdf são compostos por uma fita de polaridade positiva e outra negativa que se pareiam de ponta a ponta, garantindo maior estabilidade. A amostra padrão SiRV/SA11 foi a primeira amostra a ter seu genoma totalmente sequenciado. Atualmente, diversas amostras de RV provenientes de humanos e animais possuem as sequências de nucleotídeos dos seus 11 segmentos integralmente determinadas. Essas sequências diversas evidenciam características gerais da estrutura de cada um dos segmentos do genoma comum a todos os RV (Estes, 2001).

O genoma dos RV é rico em adenina e uracila (58-67%), sendo esta característica compartilhada com muitos genes eucarióticos e virais (Estes e Kapikian,

2007). Os segmentos de RNAdf são pareados de ponta a ponta, sendo que a fita positiva contem na extremidade 5' um *Cap* formado pela sequência $m^7GpppG^{(m)}GPy$. Características semelhantes nas porções terminais do RNA dos RV (e.g. *Cap* na extremidade 5' e sequências conservadas na extremidade 3') também são encontradas nas estruturas primárias do genoma de outros vírus segmentados, como os reovírus e os orbivírus, ambos pertencentes a família Reoviridae, assim como em genomas segmentados de vírus pertencentes a outras famílias (e.g. *Orthomyxoviridae*, *Arenaviridae* e *Bunyaviridae*) (Estes, 2001).

A fita de RNA de polaridade positiva inicia-se com uma guanidina na porção 5', seguida por um grupo de sequências conservadas não-codificadora. Em seguida, segue-se o códon de iniciação, a região aberta de leitura (ORF – *Open Reading Frame*) (que codifica para ao menos uma proteína) e o códon de parada (*stop codon*). No final de cada segmento há outro grupo de sequências conservadas não codificadora, finalizando com uma cisteína na extremidade 3'. Todos os segmentos genômicos possuem pelo menos uma ORF após o códon iniciador. Virtualmente, todos os segmentos de RNAdf dos RV são monocistrômicos. O gene 9 é bicistrônico, codificando para uma proteína VP7 imatura e outra clivada e madura. O gene 11 possui duas ORFs, presentes em todas as amostras de RV, as quais codificam para a NSP5 e NSP6 (Chan et al., 1986; Estes e Cohen, 1989; Campagna et al., 2005).

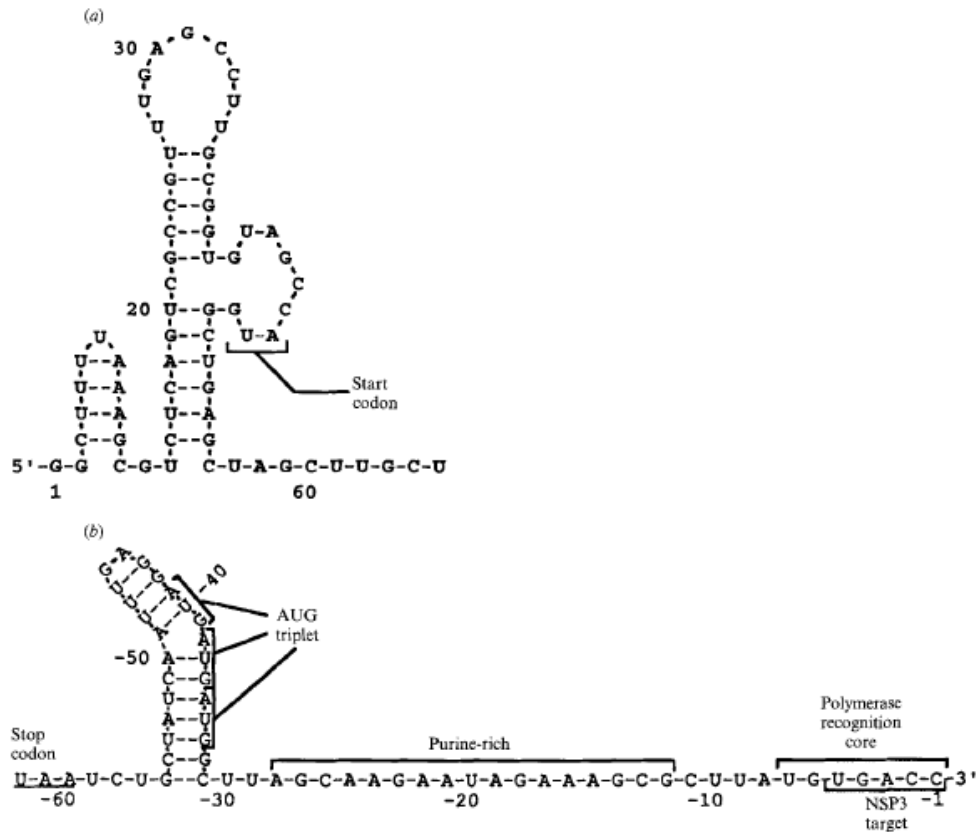
Análises comparativas revelaram que os segmentos de RV compartilham homologia apenas nas extremidades 5' e 3', sendo a sequência consenso da extremidade 5' formada por 5' GGCAUAUUAUAAUAGCC 3' e a extremidade 3' formada por 5' AUUGUUGGUAGCC 3' (Desselberger e McCrae 1994). O comprimento dessas sequências não codificadoras das regiões 3' e 5' é consideravelmente diverso, variando de 9-49pb na extremidade 5' e, de 17-182pb na extremidade 3' (Patton, 1995) (Figura 5).



Fonte: Patton, 1995

Figura 5. Representação esquemática da estrutura dos segmentos dos RV. A região aberta de leitura (ORF – *Open Reading Frame*) do genoma é limitada em ambas as extremidades por sequências não codificadoras de tamanhos variáveis. A única homologia entre os 11 segmentos dos RV encontra-se nas sequências curtas localizadas nas extremidades 5' e 3' (evidenciadas na figura).

Essas sequências homólogas são extremamente conservadas, sugerindo que possuem informações importantes para a replicação, transcrição, transporte e empacotamento do RNA, montagem da partícula viral e regulação da expressão gênica. Além das sequências primárias, as estruturas secundárias existentes nas regiões não codificadoras também podem atuar como componentes sinalizadores para a ligação de proteínas (Patton, 1995; Patton et al., 1999; Estes e Kapikian, 2007) (Figura 6).



Fonte: Patton, 1995

Figura 6. Representação esquemática das estruturas secundárias formadas pelas regiões não codificadoras das extremidades 5' e 3' do segmento 8 do RV SA11. (a) Representação da cauda poli U – poli A comum a todas as regiões não codificadoras da extremidade 5' dos 11 segmentos de RV, as quais podem formar uma estrutura em forma de haste imediatamente após os resíduos GGC 5' terminal. (b) Representação esquemática das 28pb localizadas na região 3' terminal do gene 8 dos RV. Essa porção inclui a região promotora essencial para a replicase viral (core de reconhecimento da polimerase), o sítio de ligação para a proteína NSP3 e uma região rica em purina. O códon de parada e o triplex de AUG também estão representados na figura.

Durante a replicação a fita de RNA de polaridade positiva atua de duas formas: (i) como RNAm para a síntese direta de proteínas e (ii) como molde para a síntese de fitas de polaridade negativa para produzir novos segmentos de RNAdf (Chen et al., 1994). Quando comparado com a maioria dos RNAm celulares, o RNAm dos RV são únicos, pois possuem o *Cap* na extremidade 5', entretanto não possuem a cauda poli A na extremidade 3' (Imai et al., 1983).

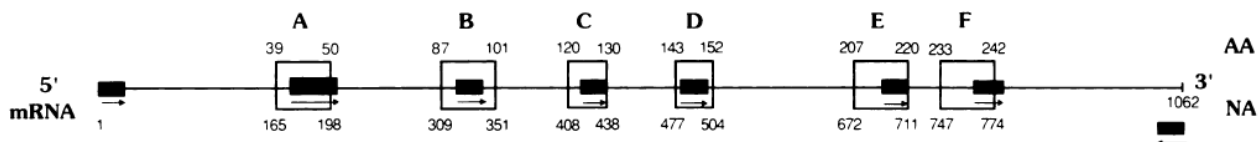
Três proteínas estruturais dos RV (VP4, VP6 e VP7) são extensivamente estudadas devido à sua importância antigênica, bioquímica e biológica na montagem e replicação dos RV. O gene VP4 possui 2359 pb de tamanho, com regiões 5' e 3' não codificadoras de 9 e 25 nucleotídeos, respectivamente. O gene VP4 contém uma longa ORF de 2325 pb de tamanho capaz de codificar uma proteína de 775 aminoácidos (Taniguchi et al., 1989). A análise da sequência de aminoácidos revelou os sítios de clivagem da VP4 em duas subunidades, chamadas de VP5* e VP8*, pela ação da tripsina. A subunidade VP5* apresenta peso molecular de 60kDa e contém 529 aminoácidos, enquanto a subunidade VP8* apresenta peso molecular de 28kDa e contém 247 aminoácidos (Gorziglia et al., 1988; Taniguchi et al., 1989; Li et al., 1993). Dois sítios de clivagem estão localizados nas argininas 241 e 247, sendo este último o sítio preferencial de clivagem. Eventualmente, ocorre uma terceira clivagem na arginina de número 231. As argininas 241 e 247 estão conservadas em todas as sequências de VP4 analisadas até o momento, sendo que a arginina 247 está correlacionada com o aumento da infectividade (Estes, 2001; Martella et al., 2003). Entre os sítios de clivagem de arginina, encontra-se o peptídeo conector (*connecting peptide*) (Gorziglia et al., 1988). Quatro cisteínas (aminoácidos 215, 317, 379 e 773) estão conservadas em todas as cepas de RV sequenciadas, com exceção da cepa de RV bovina B223 (Gorziglia et al., 1988). Uma cisteína adicional está presente na posição 266 na cepa de RV humana M37 e na posição 203 nas cepas SA11 (símia), 486 (bovina) e RV rhesus (Estes, 2001). Vinte e três resíduos de prolina estão conservados em todas as cepas analisadas (Gorziglia et al., 1988), destacando-se os resíduos de número 68, 71, 225 e 226 (Martella et al., 2003). Serina é o aminoácido mais abundante da proteína VP4 e 56 resíduos estão conservados em todas as cepas analisadas. A região com maior número de serinas conservadas encontra-se entre os aminoácidos 561 e 617 (Gorziglia et al., 1988).

As sequências do segmento 4 (codifica para a VP4) de RV pertencentes a diferentes sorotipos foram comparadas a fim de identificar regiões de divergência, entretanto a variação das sequências não são uniformemente distribuídas (Estes, 2001). Nove regiões de divergência foram identificadas (Kapikian et al., 2001). A maior variação encontra-se entre os aminoácidos 71 e 204 na proteína VP8* (Estes, 2001), a

qual também contem a maioria dos sítios antigênicos (Kapikian et al., 2001). A proteína VP5* possui atividade de neutralização heterotípica com 3 epítomos neutralizantes: epítomo I localizado entre os aminoácidos 296 e 313 (aminoácido crítico número 305/306 - Leu); epítomo II localizado entre os aminoácidos residuais 380 e 400 (aminoácido crítico número 392 – Ala) e o epítomo III localizado entre os aminoácidos 428 e 447 (aminoácido crítico número 434 – Glu) (Taniguchi et al., 1989). A VP8* possui 5 epítomos neutralizantes: M1-L10, I35-R44, I55-D66, V115-G123 e L223-P234 (Gorziglia et al., 1988; Taniguchi et al., 1989; Li et al., 1993; Padilla-Noriega et al., 1995; Kirkwood et al., 1996; da Silva et al., 2011).

A VP6 é a principal proteína estrutural dos RV e exerce um papel central na estrutura dos vírions devido a sua interação tanto com as proteínas que formam o capsídeo externo (VP4 e VP7) quanto com a VP2, componente do core. Os resíduos de aminoácidos nas posições 305 (Ala) 310 (Asn), 315 (Glu), 339 (Ser) e 342 (Met) são importantes no reconhecimento do epítomo que determina o subgrupo I (SG I) nos RV do grupo A (Estes, 2001; Kapikian et al., 2001; Martella et al., 2003). Locais imunodominantes da VP6 estão localizadas em 4 regiões: entre os aminoácidos 32-64, 155-167, 208-294 e 380-397 (Kapikian et al., 2001).

A comparação de sequências de aminoácidos de diferentes cepas de VP7 indicou a existência de 9 regiões altamente divergentes. Cada uma dessas regiões apresenta-se extremamente conservada nas cepas de RV pertencentes ao mesmo sorotipo (Kapikian et al., 2001). Em relação aos epítomos neutralizantes da VP7, 6 regiões hipervariáveis foram estabelecidas, designadas como: região antigênica A (localizada entre os aminoácidos 39 e 50), região antigênica B (localizada entre os aminoácidos 87 e 101), região antigênica C (localizada entre os aminoácidos 120 e 130), região antigênica D (localizada entre os aminoácidos 143 e 152), região antigênica E (localizada entre os aminoácidos 207 e 220) e região antigênica F (localizada entre os aminoácidos 233 e 242) (Dyall-Smith et al., 1986; Gouvea et al., 1990; Ciarlet et al., 1997b; Trinh et al., 2007; Kapikian et al., 2001, Martella et al., 2003) (Figura 7).



Fonte: Gouvea et al., 1990 adaptado pelo autor

Figura 7. Representação esquemática do gene 9 (ou gene 8) dos RVA que codifica para a glicoproteína VP7. Os quadros brancos representam a regiões hipervariáveis do genoma (A-F); AA representa a posição dos aminoácidos; NA representa a posição dos nucleotídeos.

1.4 Características Físico-Químicas

A partícula infecciosa completa dos RV tem densidade de $1,36\text{g/cm}^3$ em CsCl e sedimenta a 520-530 S em sacarose. Os RV permanecem estáveis tanto em ambientes com baixa quanto com alta umidade relativa do ar e em pH variando de 3 a 9. Os RV também são termoestáveis entre 50°C e 56°C . Ainda, os RV podem ser destruídos por ciclos repetitivos de congelamento e descongelamento (Sattar et al., 1984; Murphy et al., 1999; Estes, 2001; Kapikian et al., 2001; Steele et al., 2004).

RV não são inativados na presença de éter, clorofórmio, amônia ou hipoclorito (Steele et al., 2004). Contudo, a infecciosidade dos RV diminui significativamente após incubação a 50°C por 15 minutos (inativação), pela ação de agentes quelantes como acidoetilenodiaminotetraacético (EDTA) em pH acima de 10, pelo tratamento com duodecil sulfato de sódio (SDS) e por radiação ultravioleta (UV) (Ward e Ashley, 1980; Kapikian, 2001). Etanol, fenol, formalina e lisol são desinfetantes convenientes (Steele et al., 2004). Etanol a 95% é um desinfetante bastante efetivo na inativação de RV, uma vez que tem a capacidade de remover o capsídeo externo da partícula viral (Kapikian et al., 2001). Formaldeído 37% (1:10), hexaclorofeno 0,75% (1:3) e cloramina-T 67% (1:5) são efetivamente capazes de destruir o RV (Steele et al., 2004).

1.5 Replicação viral

Os RV infectam, preferencialmente, os enterócitos do intestino delgado

(Greenberg e Estes, 2009), entretanto uma ampla variedade de células pode ser infectada (Crowford et al., 2006; Fenaux et al., 2006). Os estudos iniciais sobre a replicação dos RV foram realizados utilizando-se linhagens celulares contínuas de rim de macaco (MA-104) analisadas por microscopia eletrônica (Estes, 2001; Estes e Kapikian, 2007). Outras informações foram obtidas com estudos em células polarizadas do epitélio intestinal e através de investigações sobre etapas específicas do ciclo de replicação utilizando expressão gênica e interação proteica em ensaios *in vitro*. Estudos envolvendo RNA de interferência (RNAi) também tem sido muito utilizados (Arias et al., 2004; Campagna et al., 2005). De modo geral, os aspectos que envolvem a replicação dos RV são complexos e únicos (Greenberg e Estes, 2009).

O ciclo replicativo dos RV inicia-se com a adsorção da partícula viral completa (TLP) à membrana plasmática da célula hospedeira. O processo de adsorção dos RV é complexo, envolve diferentes proteínas e ainda não foi completamente elucidado. Sabe-se que é dependente de sódio, que pode ocorrer entre pH 5,5 a 8,0 e à baixas temperaturas (4°C). Ainda, conhece-se a existência de mais de um receptor de membrana envolvido no processo, sendo um localizado na região apical da célula hospedeira e dependente de ácido siálico e outro localizado na região basolateral da célula e independente de ácido siálico. Em células MA-104 o processo de adsorção dura 10-12 horas à temperatura de 37°C (Estes, 2001; Ramig, 2004; Estes e Kapikian, 2007; Guerrero e Moreno, 2012).

A adsorção ocorre pela ligação entre as espículas virais do capsídeo externo dos RV, formadas pela proteína VP4 e receptores específicos presentes na membrana plasmática da célula alvo. Durante o processo de adsorção, a proteína VP4 é clivada em VP5* e VP8* pela ação da tripsina pancreática. A ligação da proteína VP5* a receptores de membrana é independente de ácido siálico. A forma glicosilada da proteína VP7 também parece estar envolvida no processo de adsorção, sendo ácido-siálico dependente. Já foi demonstrado que a VP7 se liga à proteína de choque térmico cognato 70 (*Heat shock cognate protein 70* – Hsc70) e à integrinas (Estes, 2001; Ramig, 2004; Estes e Kapikian, 2007; Guerrero e Moreno, 2012; Trask et al., 2012) (Figura 8).

Após a adsorção, a penetração viral pode seguir dois processos distintos:

penetração direta ou endocitose (indireta). Na penetração direta, ocorre a perda do capsídeo externo após a adsorção e a DLP é translocada para dentro do citoplasma como resultado da clivagem da VP4 em VP5* e VP8* pela ação da tripsina, a qual altera a permeabilidade da membrana plasmática, associado à ação de enzimas proteolíticas de provável origem pancreática (Graham e Estes, 1980; Bass et al., 1992; Estes, 2001; Estes e Kapikian, 2007). Na endocitose não ocorre a ação das enzimas proteolíticas e o TLP permanece aprisionado dentro do endossomo. O endossomo se funde a lisossomos e, aparentemente, não ocorre a replicação viral, mas sim, a degradação do RV. Esta observação sugere que não há desenvolvimento de infecção produtiva quando a penetração ocorre por endocitose (Estes, 2001; Venkataram et al., 2001; Estes e Kapikian, 2007; Santos e Soares, 2008; Trask et al., 2012) (Figura 8).

Outros estudos demonstram que na penetração direta a baixa concentração de cálcio intracelular é o fator responsável pelo desnudamento da partícula, liberando a DLP no citoplasma. Ainda, sobre o papel do cálcio no processo da penetração viral, alguns trabalhos sugerem que no processo de endocitose a baixa concentração de cálcio dentro das vesículas endocíticas solubiliza as proteínas do capsídeo externo e promovem a lise da mesma, liberando a DLP no citoplasma (Chemello et al., 2002; Pando et al., 2002; Ruiz et al., 2009a; Trask et al., 2012). Experimentos com células MA-104 demonstraram que a penetração só ocorre quando o sistema está à 37°C (ao contrário da adsorção), pois se faz necessário que a célula hospedeira esteja com suas atividades metabólicas ativas (Estes, 2001; Chemello et al., 2002).

Uma vez liberada no citoplasma, a DLP inicia o processo de replicação viral. A DLP se mantém íntegra estruturalmente durante a replicação, contendo todas as enzimas necessárias para a síntese do RNAm, atividades de transcriptase, nucleotídeo-fosforilase, guanililtransferase e metilase. A síntese do RNAm viral é mediada pela VP1 (RNA polimerase RNA-dependente). A VP1 se mantém inativa na TLP e passa a desempenhar suas atividades apenas na DLP. Para que a VP1 permaneça ativa é necessário que continue associada à VP6. Provavelmente, a VP6 mantém interação conformacional com a VP1, uma vez que sua remoção torna a VP1 inativa (Lawton et al., 2000; Estes, 2001; Ramig, 2004; Estes e Kapikian, 2007; Santos e Soares, 2008) (Figura 8).

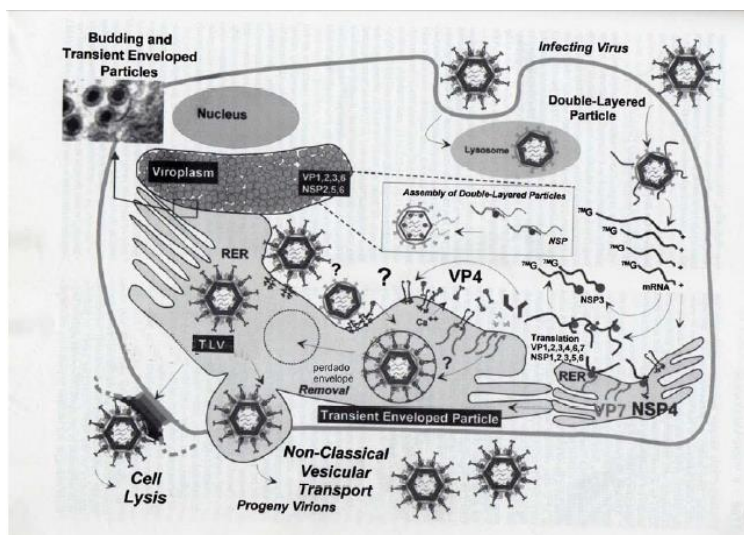
O RNA genômico de polaridade negativa serve de molde para a transcrição dos RNAm(s). Estudos demonstram que a transcrição ocorre dentro do subcore viral, pois é onde se localiza o complexo enzimático VP1+VP3. Os RNAm(s) recém-produzidos deixam o core através de canais formados pela proteína VP2. Múltiplos RNAm(s) podem ser liberados simultaneamente. Os RNAm(s) servem tanto para o processo de tradução e síntese de proteínas, quanto de molde para a síntese do RNAdf, dando origem ao genoma da progênie viral (Lawton et al., 2000; Estes e Kapikian, 2007).

Com exceção da VP7 e da NSP4, todas as VPs e NSPs são sintetizadas nos ribossomos livres do citoplasma. A VP7 e NSP4 são sintetizadas pelos ribossomos aderidos ao RER, onde a VP7 é inserida na membrana do RER orientada para o lúmen, enquanto a NSP4 é orientada para o citoplasma. A NSP5 é sintetizada por ribossomos livres, entretanto é glicosilada pelo RER. O processo de tradução dos RNAm(s) é auxiliado pela NSP3 e não há participação do Complexo de Golgi no processo de glicosilação das proteínas virais (Estes e Kapikian, 2007; Maruri-Avidal et al., 2008; Santos e Soares, 2008).

A montagem da partícula viral ocorre dentro dos viroplasmas, que são estruturas especializadas e eletrodensas características da replicação dos RV. Os mecanismos envolvidos na montagem da partícula viral ainda não foram completamente desvendados. O viroplasma contém: o RNAdf sintetizado durante a replicação que permanece complexado às proteínas do core (VP1, VP2 e VP3), VP6, NSP2 e NSP5. Dessa forma, a DLP é formada dentro do viroplasma. Os viroplasmas contendo DLPs migram para o RER, onde estão a VP7 e a NSP4. As demais proteínas não-estruturais (NSP1, NSP3, NSP6) e a proteína estrutural VP4, sintetizadas nos ribossomos livres do citoplasma, também migram para o RER. A replicação do RNAdf ocorre exclusivamente no interior das DLP e, portanto, nunca são encontrados RNAdf livres no citoplasma celular (Estes, 2001; Silvestri et al., 2004; Campagna et al., 2005; Estes e Kapikian, 2007; Maruri-Avidal et al., 2008; Trask et al., 2012) (Figura 8).

As DLP montadas no interior dos viroplasmas brotam para o interior do RER, levando consigo parte da membrana e permanecendo transitoriamente com envoltório. À medida que migram pelo interior do RER, recebem as proteínas que irão formar o capsídeo externo (VP7 e VP4). Acredita-se que a VP4 é acrescentada à partícula viral

antes desta entrar no RER, uma vez que a maturação final das partículas ocorre no interior da organela e é dependente de altas concentrações de cálcio. Dentro do RER, o envoltório é removido, provavelmente por um processo controlado pela NSP4. O ultimo passo desse processo é a adição da VP7, originando a TLP. A TLP migra pelo citoplasma e é liberada por lise celular no lúmen do intestino delgado (Estes, 2001; Ramig, 2004; Silvestri et al., 2004; Estes e Kapikian, 2007; Maruri-Avidal et al., 2008; Santos e Soares, 2008) (Figura 8).



Fonte: Estes, 2001

Figura 8. Esquema de replicação dos RV.

1.6 Patogênese

A transmissão do RV é, classicamente, pela via fecal-oral. A infecção causa alterações no epitélio do intestino delgado, principalmente no jejuno, resultando em diarreia (Ramig, 2004; Santos e Soares, 2008). O mecanismo pelo qual o RV causa diarreia ainda não foi completamente esclarecido, entretanto inúmeros aspectos envolvendo a patogênese das infecções causadas por RV foram revelados através de estudos utilizando modelos animais e cultura de células (Barnes e Townley, 1973; Davidson e Barnes, 1979; Lundgren e Svensson, 2001; Ramig, 2004; Greenberg e Estes, 2009). Esses trabalhos levam a crer que a diarreia causada por RV dificilmente

poderá ser explicada pela ação de um único processo, mas sim, pela ação conjunta de diferentes mecanismos atuando simultaneamente (Anderson e Weber, 2004).

Entre as células que compõem o intestino delgado encontram-se os enterócitos e as células da cripta. Os enterócitos são células maduras (apicais) e não proliferativas que recobrem as vilosidades; atuam na absorção dos nutrientes e sintetizam enzimas, contribuindo para a digestão dos alimentos. A absorção dos nutrientes ocorre tanto pela ação de mecanismos de difusão passiva de solutos (e.g. gradiente osmótico), quanto por transporte ativo (Santos e Soares, 2008). As células da cripta (basais) são as células precursoras dos enterócitos; não apresentam capacidade de absorção e secretam íons cloro (Cl^-) no lúmen intestinal. A atuação em conjunto das células da cripta e dos interceptos estabelece o fluxo bidirecional de eletrólitos através do epitélio intestinal: absorção dos nutrientes pelos enterócitos e secreção de Cl^- pelas células da cripta (Santos e Soares, 2008).

Os RV tem tropismo pelas células apicais que recobrem as vilosidades do intestino delgado, dessa forma, após sua ingestão, o RV é carregado para esta localidade, onde infecta os enterócitos maduros (Holmes et al., 1975; Ramig, 2004; Lopez e Arias, 2006). Ao se propagar nos enterócitos, o RV provoca a descamação dessas células (Venkataram et al., 1997; Ramig, 2004). O vírus não é replicado nas células da cripta, entretanto com a destruição dos enterócitos, a migração dessas células para as vilosidades é acelerada, provocando a perda temporária da capacidade absorptiva do intestino e levando ao quadro de diarreia (Venkataram et al., 1997; Ramig, 2004; Santos e Soares, 2008).

Como descrito no item anterior, a internalização do RV nos enterócitos pode ocorrer tanto por penetração direta quanto por endocitose (Lundgren e Svensson, 2001). Após a replicação citolítica do RV dentro dos enterócitos maduros, as novas partículas virais podem infectar as porções mais distais do intestino delgado e/ou serem excretadas pelas fezes. Durante a infecção, cerca de 10^{10} - 10^{11} partículas virais por grama de fezes são excretadas (Desselberger, 1999).

As lesões causadas pelo RV durante sua replicação variam de leves, como vacuolização e lise dos enterócitos, até graves, como hiperplasia da cripta, encurtamento e atrofia das vilosidades e formação de microvilosidades esparsas e

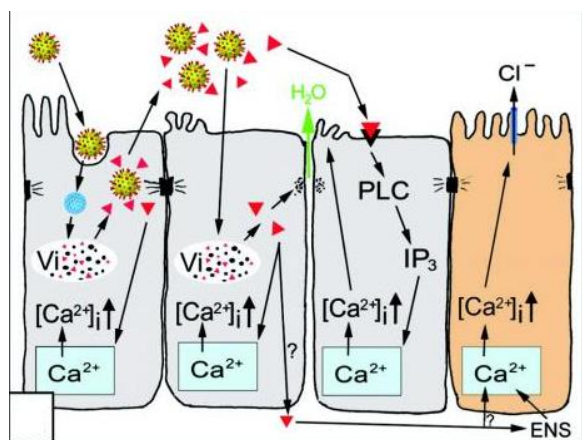
irregulares ao longo do epitélio intestinal (Bishop et al., 1973; Ramig, 2004). Entretanto, o quadro sintomático da infecção por RV não está relacionado somente às lesões histológicas observadas e possui tanto componentes mal absorptivos quanto secretórios (Ramig, 2004; Lorrot e Vasseur, 2007).

A má absorção é consequência da não digestão dos carboidratos, gorduras e proteínas no lúmen intestinal, os quais impedem a absorção normal de água por osmose (diarreia osmótica) (Lorrot e Vasseur, 2007; Hagbom et al., 2012). Estudos recentes apontam que a proteína NSP4 exerce papel crucial no desenvolvimento do quadro diarreico causado por RV, uma vez que exibe funções de enterotoxina (Lorrot e Vasseur, 2007). A NSP4 funciona como mediadora da desregulação da homeostase de cálcio (Ca^{2+}) induzida pelo RV. A NSP4 é sintetizada pelos ribossomos aderidos ao RER e permanece inserida na membrana do mesmo até a formação das DLPs. Durante a migração das DLPs pelo RER e formação das TLPs, a NSP4 promove a desestruturação de sua membrana plasmática e o consequente efluxo Ca^{2+} para o citosol da célula infectada. A alta concentração de Ca^{2+} no citosol inibe os sistemas de co-transporte de sódio (Na^+) e outros solutos, promovendo a degeneração do citoesqueleto que sustenta as microvilosidades. A destruição do citoesqueleto atrofia e degenera as microvilosidades, além de diminuir a secreção de dissacarídeos e enzimas digestivas para o lúmen, acarretando em necrose e descamação (Ramig, 2004; Lorrot e Vasseur, 2007) (Figura 9). Ainda, a infecção por RV induz um aumento na concentração de Na^+ e diminuição da concentração de potássio (K^+) citoplasmático (decorrente da inibição dos sistemas de co-transporte). Essas alterações intracelulares de Na^+ e K^+ também comprometem a absorção de cloreto de sódio (NaCl) e nutrientes, contribuindo para a perda de fluido (Lorrot e Vasseur, 2007; Hagbom et al., 2012).

A NSP4 também parece estar envolvida na destruição dos desmossomos, alterando a permeabilidade paracelular. Essa alteração libera água e eletrólitos para o espaço intersticial e contribui para a diarreia osmótica (Ramig, 2004; Lorrot e Vasseur, 2007). Acredita-se ainda que a NSP4 tenha efeito parácrino nas células não infectadas, alterando a fosfolipase C-inositol 1,3,5 trifosfato (PLC-IP3) e liberando Ca^{2+} do RER no citosol (Ramig, 2004).

O componente secretório da diarreia por RV parece ser secundário a mal

absorção, mas também requer o envolvimento da NSP4 (Santos e Soares, 2008). A função exata dessa proteína nesse componente ainda não está completamente definida. A NSP4 atua nas células da cripta, induzindo o aumento da concentração de Ca^{2+} no citosol e, conseqüentemente, promovendo a secreção de Cl^- no lúmen intestinal. A secreção de Cl^- pode ser decorrência da NSP4 atuando diretamente como canal de Cl^- ou decorrência da NSP4 ativar um canal de $\text{Cl}^- - \text{Ca}^{2+}$ dependente. Essas alterações culminam com a liberação de água (Ramig, 2004; Lorrot e Vasseur, 2007). A NSP4 também parece contribuir para o componente secretório da diarreia através da estimulação direta do Sistema Nervoso Entérico (SNE), localizado logo abaixo das vilosidades (Lundgren et al., 2000; Lorrot e Vasseur, 2007).



Fonte: Ramig, 2004 adaptado pelo autor

Figura 9. Principais eventos da patogênese da infecção por RV no epitélio intestinal. As células em cinza representam enterócitos e a célula em laranja a célula da cripta. Vi: viroplasma; triângulo vermelho: NSP4; ENS: sistema nervoso entérico.

Estudos recentes sugerem que a infecção por RV pode se disseminar pelo organismo hospedeiro e resultar em uma infecção sistêmica (Ramig, 2004; Candy, 2007; Medici et al., 2011). Em modelos animais, RV já foi detectado em Placas de Peyer, nódulos linfáticos mesentéricos, pulmões, fígado, rins e ducto biliar (Ramig, 2004). Manifestações neurológicas associadas à infecção por RV também são relatadas e ocorrem em aproximadamente 2-5% dos casos, variando de convulsões benignas à encefalites letais (Takanashi et al., 2010; Medici et al., 2011). Entretanto

ainda não está claro se o RV permanece ativo e replicando nos sítios extra-intestinais ou se é apenas transferido passivamente pela corrente sanguínea (Ramig, 2004). Esses dados juntos sugerem que a patogenia causada por RV pode ser ainda mais complexa do que é considerada atualmente.

1.7 Classificação dos rotavírus

O gênero *Rotavirus* engloba vírus que infectam somente vertebrados (aves e mamíferos) (Van Regenmortel et al., 2005). Os RV são classificados em grupos, subgrupos, sorotipos e genótipos de acordo com suas características antigênicas e moleculares. Este critério permite a classificação de múltiplos grupos e subgrupos e a existência de inúmeros sorotipos dentro de cada grupo (Kapikian e Chanock, 1996).

Estudos utilizando técnicas sorológicas, imunofluorescência, ensaios imunoenzimáticos e microscopia eletrônica, revelaram que os RV possuem um antígeno comum, a proteína VP6, presente no capsídeo intermediário. Esse antígeno comum foi denominado antígeno de grupo (Estes, 2001). De acordo com o 9º Informe do Comitê Internacional de Taxonomia Viral (*9th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses – ICTV 2012*), os determinantes antigênicos de grupo conferidos pela VP6 permitem a classificação dos RV em 5 espécies sorológicas: *Rotavirus A* (RVA), *Rotavirus B* (RVB), *Rotavirus C* (RVC), *Rotavirus D* (RV) e *Rotavirus E* (RVE) (<http://ictvonline.org>), além de 3 tentativas adicionais de espécies: *Rotavirus F* (RVF), *Rotavirus G* (RVG) e *Rotavirus H* (RVH) (Van Regenmortel et al., 2005; Estes, 2001; Ball, 2005; Johne et al 2011; Matthijssens et al., 2011; Wakuda et al., 2011; Patton, 2012). Essas espécies de RV são comumente chamadas de grupos de RV (Matthijssens et al., 2011).

Recentemente, Kindler et al. (2012) realizaram o sequenciamento do genoma completo de RVF (cepa 03V0568) e RVG (strain 03V0567). Ambos RV possuem as ORFs que codificam para as proteínas estruturais de VP1 a VP7 e para as proteínas não-estruturais de NSP1 a NSP5, localizadas em seus 11 segmentos. A identidade da sequência de nucleotídeos comparada com os outros grupos de RV varia de 29,8% a 61,7% para RVF e, de 29,3% a 65,9% para RVG, confirmando as suas respectivas

classificações em espécies distintas.

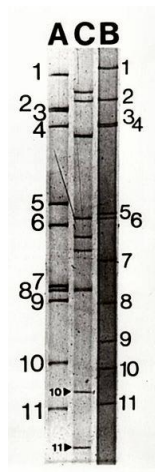
RVA, RVB e RVC estão associados à gastroenterites agudas em humanos e animais, sendo o RVA epidemiologicamente importante em humanos, bovinos e outros animais. O RVB foi detectado em humanos, bovinos, carneiros, suínos, cabras e ratos; RVC infecta suínos, humanos, bovinos, cães e furões (*ferrets*) (Estes, 2001). Os RVD, RVE, RVF e RVG foram detectados somente em animais (Kapikian et al., 2001; Kapikian e Estes, 2002; Ball, 2005; Matthijssens et al., 2011). RVD, RVF e RVG afetam apenas aves, sendo que o RVD foi detectado em frangos, faisões e perus; RVF em frangos e faisões e RVG em frangos. O RVE foi detectado apenas em suínos (Estes, 2001; Steele et al., 2004; Villarreal et al., 2006; Dhama et al., 2009). RVH (cepas J19, B219 e ADRV-N) foi detectado em humanos na China (Jiang et al., 2008; Nagashima et al., 2008; Johne et al., 2011) e Bangladesh (Alam et al., 2007) e, mais recentemente, em suínos no Japão (cepa SKA-1) (Wakuda et al., 2011) e no Brasil (cepas BR60, BR63 e BR59) (Molinari et al., 2014). Os RV mais prevalentes, tanto em humanos quanto em animais, são os RVA (Matthijssens et al., 2011). Dessa forma, os demais grupos de RV podem ser comumente denominados de RV do grupo não-A.

O padrão de migração dos 11 segmentos de RNA_{df} em eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) também pode ser utilizado como ferramenta alternativa na classificação presuntiva dos grupos de RV (Ciarlet e Estes, 2002; Martella et al., 2007a). Baseando-se nessa propriedade característica dos RV e considerando aqueles RV capazes de infectar tanto humanos quanto animais, o RVA apresenta padrão de migração 4-2-3-2; o RVB apresenta padrão de migração 4-2-2-3 e o RVC apresenta padrão de migração 4-3-2-2 (Snodgrass et al., 1984; Gouvea et al., 1991; Saif e Jiang, 1994; Ciarlet e Estes, 2002; Steele et al., 2004; Dhama et al., 2009) (Figura 10).

1.8 Rotavírus do grupo A

Os três grupos de RV que infectam humanos (A, B e C) têm características epidemiológicas e importância em saúde pública marcadamente distintas (Meleg et al., 2008). O RVA é mundialmente reconhecido como o principal enteropatógeno causador de gastroenterite grave em crianças e animais (Estes e Kapikian, 2007; Matthijssens

et al., 2008b).



Fonte: http://en.wikipedia.org/wiki/File:Rotavirus_A,_B,_C_PAGE.jpg

Figura 10. Eletroforese em gel de poliacrilamida evidenciando o padrão de migração característico dos 11 segmentos de RNAdf dos RVA, RVB e RVC.

1.8.1 Classificação dos rotavírus do grupo A

O RVA é classificado utilizando diferentes abordagens, incluindo: (i) propriedades antigênicas da VP6, VP7 e VP4 (subgrupos, sorotipos G e sorotipos P, respectivamente); (ii) padrão de migração dos 11 segmentos de RNAdf em EGPA (longo, curto, super-curto ou atípico); (iii) padrão de hibridização do genoma completo de RNA (genogrupos) e (iv) análise das seqüências nucleotídicas (genótipos) (Estes e Kapikian, 2007; Matthijnsens et al., 2011).

1.8.1.1 Genogrupos de rotavírus grupo A

A relação genética de parentesco entre segmentos homólogos do genoma RNAdf dos RVA é avaliada através de ensaios de hibridação RNA-RNA (Nakagomi et al., 1989) e, mais recentemente, através de comparações diretas de seqüências de nucleotídeos (Matthijnsens et al., 2008b). A hibridação RNA-RNA forneceu evidências moleculares que mostram a relação genética próxima existente entre cepas

de RVA humanas e animais (Matthijssens et al., 2008b).

A utilização dessas metodologias permitiu que três genogrupos humanos fossem estabelecidos para os RVA humanos, representados pelas amostras de referência Wa (G1P[8]), DS-1 (G2P[4]) e AU-1 (G3P[9]) (Nakagomi et al., 1989; Matthijssens et al., 2008b). Diversos genogrupos animais também foram identificados, entretanto a relação genética entre eles e destes com os genogrupos humanos ainda não foi completamente elucidada (Nakagomi et al., 1991).

1.8.1.2 Subgrupos de rotavírus grupo A

Historicamente, a VP6 foi a primeira proteína a ser usada na classificação do RVA, uma vez que após a infecção, anticorpos contra VP6 são facilmente detectados (Svensson et al., 1987; Ciarlet e Estes, 2002). Os ensaios diagnósticos imunológicos mais sensíveis também são baseados nessa proteína (Matthijssens et al., 2008b).

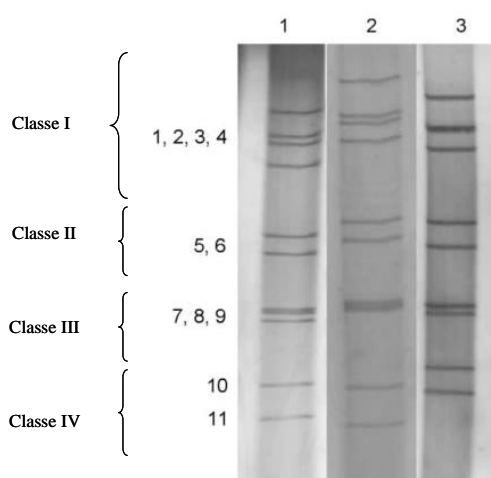
A VP6 apresenta epítomos diferentes, os quais permitem classificar o RVA em subgrupos (SG) distintos: SG I (comum em animais e pouco frequente em humanos), SG II (comum em humanos e pouco frequente em animais), SG I+II (pouco frequente em humanos e animais) e SG não-I não-II (comum em aves e pouco frequente em humanos e animais). Esses SG são identificados de acordo com a reatividade que o RVA apresenta contra anticorpos monoclonais (MAbs) (Hoshino e Kapikian, 1994; Estes e Kapikian, 2007; Matthijssens et al., 2008b). Mais recentemente, com base em caracterização molecular, somente 2 grupos (também denominados genogrupos) foram diferenciados entre os RVA: o genogrupo I, formado pelo SG I; e o genogrupo II que contém os SG II, SG I+II e SG não-I não-II (Iturriza-Gómara et al., 2002; Matthijssens et al., 2008b).

1.8.1.3 Perfil eletroforético dos rotavírus do grupo A

Como citado anteriormente, os 11 segmentos de RNA_d do RVA apresentam o padrão de migração eletroforético 4-2-3-2. Esse padrão é dividido em 4 classes: Classe I composta pelos segmentos 1, 2, 3 e 4; Classe II composta pelos segmentos 5 e 6;

Classe III composta pelos segmentos 7, 8 e 9 e Classe IV composta pelos segmentos 10 e 11 (Figura 11) (Lourenço et al., 1981).

Os genes 10 e 11 (que compõem a Classe IV) apresentam posições diferentes que variam de acordo com maior ou menor velocidade de migração, caracterizando os padrões eletroforéticos “longo”, “curto” e “super-curto” (Lourenço et al., 1981). Na maioria das vezes, as amostras de RVA com perfil eletroforético “longo” pertencem ao SGII, enquanto aquelas que apresentam perfil eletroforético “curto” pertencem ao SGI (Estes e Kapikian, 2007).



Fonte: Urbina et al., 2004 modificado pelo autor

Figura 11. Eletroforese em gel de poliácridamida evidenciando o padrão de migração característico dos 11 segmentos de RNA_{df} de RVA. Os números a esquerda indicam os segmentos de RNA_{df} referentes as quatro regiões variáveis do genoma e suas respectivas classes. As linhas 1 e 2 evidenciam amostras de RVA que apresentam padrão longo de migração eletroforética, enquanto a linha 3 evidencia amostra de RVA que apresenta padrão curto de migração eletroforética.

1.8.1.4 Sistema binário de classificação dos rotavírus do grupo A

Em 1989, um sistema binário de classificação (derivado do sistema de classificação utilizado para os vírus influenza) foi estabelecido para RVA, sendo baseado em reações imunológicas e na estrutura dos genes das duas proteínas que compõem o capsídeo externo, VP7 e VP4, as quais, independentemente, estimulam a

produção de anticorpos neutralizantes (Ciarlet e Estes 2002). Dessa forma, as cepas de RVA são classificadas em VP4 ou “sorotipos P” (P refere-se à sensível à protease – *protease sensitive*) e VP7 ou “sorotipos G” (G refere-se à glicoproteína - *glycoprotein*) (Estes e Kapikian, 2007; Matthijnsens et al., 2008b).

A classificação dos RVA em sorotipos VP7 e VP4 é realizada por ensaios de neutralização cruzada utilizando soros hiperimunes. Essa técnica é demorada, requer coleções virais, reagentes imunológicos apropriados e está disponível em poucos laboratórios de pesquisa. Com o advento da biologia molecular, principalmente a reação em cadeia pela polimerase e o sequenciamento genético, a classificação antigênica vem sendo gradualmente substituída pelo sistema de classificação das proteínas VP4 e VP7 em “genótipos” com base na identidade entre as sequências dos segmentos de genes cognatos de RVA (Matthijnsens et al., 2008b). O gene 9 que codifica para a proteína VP7 contém 6 regiões sorotipo-específicas (hipervariáveis) nomeadas de A a F. Essas regiões são constituídas de aminoácidos altamente conservados entre as cepas do mesmo sorotipo, porém com variações entre cepas de sorotipos diferentes (Trinh et al., 2007). A proteína VP4 é clivada em duas subunidades proteicas indicadas com asterisco: VP5* e VP8*. A VP8* possui os sítios sorotipo-específicos localizados na região hipervariável entre o aminoácidos 71 e 204 (Gorziglia et al., 1988; Taniguchi et al., 1989; Li et al., 1993).

Até o momento, 27 genótipos G e 37 genótipos P foram descritos em RVA provenientes de humanos e animais (Matthijnsens et al., 2011; Trojnar et al., 2013). Os ensaios de neutralização e os de biologia molecular revelam resultados concordantes quanto à classificação da VP7 e, dessa forma, os RVA são designados quanto ao sorotipo/genótipo G por um único número arábico (e.g. G1, G2, G3, e assim por diante). Entretanto, o mesmo não ocorre com a classificação da VP4, a qual exhibe resultados discordantes, existindo um sistema duplo para a tipagem P. Os sorotipos P (quando conhecidos) são designados por números arábcos, eventualmente seguidos por uma letra maiúscula (e.g. P1A, P2C, P6), enquanto os genótipos P são designados por números arábcos entre colchetes (e.g. P[8], P[4]). Quando a classificação sorotípica e genotípica de P são conhecidas, a VP4 pode ser representada por ambas as designações (e.g. P1A[8], P1B[8], P2C[6], P4[10]). A classificação de P em

genótipos é o método mais utilizado, devido a grande dificuldade em se padronizar os ensaios para determinação de sorotipos VP4 (Estes e Kapikian, 2007; Matthijnssens et al., 2008b; Greenberg e Estes, 2009).

1.8.1.5 Nomenclatura dos rotavírus do grupo A

A nomenclatura das amostras de RV pertencentes aos diferentes grupos segue as normas estabelecidas pelo ICTV. Entretanto, esta nomenclatura é mais amplamente empregada para os RVA, devido à sua reconhecida importância epidemiológica nas diferentes espécies animais, incluindo os humanos, e sua complexa diversidade genética (Matthijnssens et al., 2011).

O ICTV sugere que a amostra de RV seja identificada da seguinte forma: “*Grupo ou espécie de RV/espécie de origem/país de origem/nome comum/ano de identificação/Tipo-G e tipo-P*”, onde: (a) O *grupo ou espécie de RV* refere-se aos RVA, RVB, RVC, etc; (b) A *espécie de origem* contém dois componentes. O primeiro componente considera 3 fatores: (i) animal onde o RV foi detectado (e.g. humana, bovina, suína); (ii) se a amostra foi detectada no ambiente (e.g. esgoto, solo, rio), a abreviação “*Env*” deve ser utilizada e (iii) se a espécie for desconhecida, a denominação “*X*” deverá ser empregada. O segundo componente se refere a utilização de “*-wt*” para tipo selvagem (*wild type*); “*-tc*” para adaptado de cultura de tecido (*tissue culture-adapted*) e “*-lab*” para amostra gerada em laboratório (*laboratory-generated*); (c) O *país de origem* é identificado por três letras de acordo com <https://www.cia.gov/library/publications/the-world-factbook/appendix/appendix-d.html>; (d) O *nome comum* se refere a identificação da amostra, sendo nomeada pelos investigadores ou laboratório que a identificou; (e) O *ano de identificação* utilizando o formato “*yyyy*”; se o ano for desconhecido deverá ser representado por “*XXXX*”; (f) O *Tipo-G* identificado pelo seu número arábico correspondente (e.g. G1, G2); se o genótipo for desconhecido deverá ser representado por “*GX*”; (g) O *Tipo-P* identificado por “*Py[z]*”, onde *y* representa o número do seu sorotipo e *z* (entre colchetes) o número de seu genótipo; se o sorotipo de P for desconhecido, utiliza-se somente o genótipo “*P[z]*”; se o genótipo P for desconhecido utiliza-se “*Py[X]*” ou “*P[X]*”. Dessa forma, uma amostra padrão de

RVA é descrita como “RVA/Simian-tc/USA/RRV/1975/G3P[3]” (Van Regenmortel et al., 2005; Matthijssens et al., 2011).

1.8.1.6 Sistema de classificação do genoma completo de rotavírus do grupo A: constelação de genótipos

Em abril de 2008, um sistema de classificação baseado na análise nucleotídica do genoma completo foi proposto para o RVA (Matthijssens et al., 2008b; Matthijssens et al., 2011). Esse sistema atribui um genótipo específico para cada um dos 11 segmentos de RNA_{df} com base na identidade nucleotídica e percentuais de *cut-off* (Matthijssens et al., 2008b), onde os genes VP7-VP4-VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5/6 das cepas de RVA são descritos utilizando as abreviações Gx-P[x]-Ix-Rx-Cx-Mx-Ax-Nx-Tx-Ex-Hx (x representa o número arábico iniciando-se a partir do 1), respectivamente (Matthijssens et al., 2008b; Matthijssens et al., 2011). Dessa forma, a cepa RVA/Horse-tc/GBR/L338/1991/G13P[18] é classificada como “G13-P[18]-I6-R9-C9-M6-A6-N9-T12-E14-H11” (Tabela 2) (Matthijssens et al., 2012).

Os valores percentuais de *cut-off* para cada um dos 11 segmentos do genoma de RVA foram calculados com base nas sequências das ORFs completas. Se apenas uma sequência parcial da ORF proveniente de um determinado segmento do genoma estiver disponível, não é possível atribuir o genótipo de forma correta, uma vez que a diversidade genotípica na ORF completa não é constante. Algumas regiões da ORF podem ser altamente variáveis, enquanto outras podem ser mais conservadas. Aplicar estas percentagens de *cut-off* para apenas uma parte da ORF, pode levar a conclusões erradas. Uma sequência parcial do gene poderá ser utilizada para atribuir um genótipo de RVA quando pelo menos 50% da sequência da ORF for determinada, sendo que a sequência deve ter tamanho ≥ 500 pb. Ainda, a identidade da cepa a ser determinada (quando comparada a cepa pertencente a um genótipo estabelecido) deverá ser de pelo menos 2% superior ao valor de *cut-off* determinado (Tabela 2) (Matthijssens et al., 2008b).

Tabela 2. Classificação dos genótipos dos 11 segmentos de RNA_d de RVA de acordo com o percentual de identidade nucleotídica (*cut-off*).

Proteína	Percentual de identidade (valor de <i>cut-off</i>)	Número de genótipos	Nome dos genótipos
VP7	80%	26G	Glicoproteína
VP4	80%	35P[z]	sensível à Protease
VP6	85%	16I	capsídeo Intermediário
VP1	83%	9R	RNA polimerase - RNA dependente
VP2	84%	9C	proteína do Core
VP3	81%	8M	M etiltransferase
NSP1	79%	16 ^a	A ntagonista a interferon
NSP2	85%	9N	N T Pase
NSP3	85%	12T	<i>T</i> ranslation Enhancer
NSP4	85%	14E	E nterotoxina
NSP5	91%	11H	<i>p</i> Hosphoprotein

Fonte: Matthijnssens et al., 2008b; Matthijnssens et al., 2011 modificado pelo autor

A análise da sequência completa do genoma do RVA aumentou significativamente a capacidade de reconhecer as relações genéticas entre as cepas humanas e animais (Matthijnssens et al., 2011). Visando a manutenção, avaliação e desenvolvimento do sistema de classificação dos RV, foi criado o Grupo de Trabalho para Classificação dos Rotavírus (*Rotavirus Classification Working Group – RCWG*) composto por pesquisadores do mundo todo (Matthijnssens et al., 2011).

O RCWG também atua junto ao *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) no desenvolvimento de um banco de dados específico para depositar as sequências de RV. Esse banco irá conter sequências genômicas completas e anotadas utilizando a ferramenta VIGOR (*Viral Genome ORF Reader*), assim como diversos tipos de metadados (e.g. clínicos e epidemiológicos), os quais irão prover informações adicionais importantes aos investigadores. O novo banco de dados de RVA será semelhante ao banco de dados disponível para o vírus influenza (*Influenza Virus Resource*) e pretende normatizar a nomenclatura das cepas para RVA (Wang et al.,

2010; Matthijnsens et al., 2011).

1.8.2 Imunidade contra rotavírus do grupo A

Embora muitos estudos tenham sido realizados visando compreender a resposta imune resultante da infecção por RVA em humanos e animais, os mecanismos que conferem essa proteção ainda não estão totalmente desvendados (Linhares e Bresee, 2000). Acredita-se que a proteção contra os RVA envolva anticorpos locais (mucosas), sistêmicos e a resposta imune celular (Bishop et al., 1983; Offit et al., 1986). Investigações sobre o papel da imunidade celular na infecção por RVA são realizadas principalmente utilizando modelos animais e cultura de células (Offit, 1996; Angel et al., 2012), entretanto, entre os modelos animais, somente coelhos, camundongos lactentes e leitões gnotobióticos mimetizam a infecção de RVA em crianças (Molyneaux, 1995).

A indução do sistema interferon (INF) proveniente da defesa celular inata é crucial no controle das infecções virais em geral, e o RVA não é uma exceção. O RVA é reconhecido pelas células do sistema imune, as quais evocam a cascata de eventos que conduzem a ativação de fatores de transcrição, fator regulatório de INF 3 (*INF regulatory factor 3* - IRF3) e fator nuclear Kappa B (*Nuclear Factor-KappaB* - NF-κB). Esses fatores, por sua vez, induzem a liberação de INFs tipo I (INF-a e INF-b) (Wilkins e Gale, 2010; López e Arias, 2012). Estudos recentes revelaram que o RVA utiliza diferentes estratégias para evadir a resposta imune celular; sendo que cada estratégia parece ser específica para o tipo de cepa de RVA e tipo celular utilizados (López e Arias, 2012).

O RNAdf parece ser o principal mediador envolvido na indução de INF em resposta à infecção viral. Sensores celulares detectam a presença do RNAdf e ativam uma cascata de eventos que promove a inibição da síntese de proteínas celulares e a transcrição dos genes que codificam para INF e citocinas, induzindo à morte celular (Rehwinkel e Reis e Sousa, 2010; López e Arias, 2012). Acredita-se que o RNAdf dos RVA permaneça escondido do sistema INF, uma vez que a replicação viral ocorre dentro dos viroplasmas (McDonald e Patton, 2011). Entretanto, alguns estudos demonstram que o RNAdf dos RVA pode ser detectado no citoplasma fora dos

viroplasmas em células infectadas (Rojas et al., 2010).

A infecção natural por RVA confere proteção clínica significativa durante uma eventual reinfeção (Linhares e Bresee, 2000; Angel et al., 2012). Estudos de coorte conduzidos no México e em Guiné-Bissau mostraram que episódios recorrentes de infecção por RVA são significativamente mais brandos que o primeiro. Um episódio de infecção por RVA apresenta uma eficácia protetora contra uma segunda infecção de 70% e 77% em Guiné-Bissau e México, respectivamente (Velazquez et al., 1996; Fischer et al., 2002). Entretanto, essa proteção pode ser de curta duração, incompleta (Bishop et al., 1983) ou idade-dependente (Ward et al., 2006). Por outro lado, um estudo recente conduzido na Índia demonstrou que a gravidade da diarreia por RVA não diminuiu de forma significativa entre a primeira e a segunda infecção, mas sim, entre a segunda e a terceira infecção (Gladstone et al., 2011). Nessa coorte indiana houve uma incidência de 53% de infecção por RVA afetando crianças de aproximadamente 6 meses de idade, logo após o declínio dos anticorpos maternos adquiridos pela via transplacentária (Gladstone et al., 2011; Angel et al., 2012). Considerando-se que a capacidade de produção de anticorpos é idade-dependente, uma infecção primária por RVA tão precoce pode não induzir de forma eficiente a resposta protetora do sistema imune e, conseqüentemente, diminuir a eficácia da infecção natural em induzir altos níveis de anticorpos protetores (Ward et al., 2006; Angel et al., 2012). A ocorrência desse evento pode ser justificada pelo fato dos RVA apresentarem múltiplos grupos, subgrupos e sorotipos virais (Anderson e Weber, 2004).

Estudos conduzidos com adultos voluntários, avaliando-se tanto infecções naturais quanto ensaios vacinais, indicam que a presença de anticorpos séricos pode ser considerada um bom marcador de proteção. O papel dos anticorpos intestinais (considerando que o sítio de replicação do RVA é o intestino delgado) na proteção da infecção ainda não foi demonstrado de forma consistente, devido à dificuldade de coleta de fluídos entéricos de crianças com diarreia, à instabilidade dos anticorpos no intestino e à variação na sensibilidade dos métodos de detecção utilizados. Ainda, os níveis das células *Natural Killers* (NK), linfócitos T citotóxicos (CTL) e citocinas, as quais podem exercer efeitos reais na proteção contra a infecção por RVA, são muito

difíceis de serem mensurados (Jiang et al., 2002).

Tanto infecções primárias quanto secundárias causadas por RVA são capazes de promover a produção de anticorpos das classes IgG, IgM e IgA no soro, saliva e secreções intestinais (Richardson e Bishop, 1990; Bhan et al., 1993). A VP6 é reconhecidamente a proteína mais imunogênica, estimulando a produção de IgA, principalmente, na mucosa do intestino delgado (Burns et al., 1996). A presença de IgA contra a VP6 em secreções reflete a habilidade de neutralização viral pelo hospedeiro e, conseqüentemente, imunidade de mucosa e resistência a reinfecção (Molyneaux, 1995).

Sabe-se que as proteínas VP7 e VP4 também são capazes de estimular a produção de anticorpos séricos neutralizantes, conferindo proteção sorotipo-específico (homotípica) aos hospedeiros (Offit et al., 1986; Hoshino et al., 1988; Ward et al., 1996). Embora a resposta imunológica clássica dos RVA seja homotípica, também existe uma limitada resposta heterotípica, reagindo de forma cruzada com os múltiplos sorotipos (Jiang et al., 2002). Estudos indicam que anticorpos contra RVA específicos para VP7 ou VP4 precisam estar presentes na superfície da mucosa intestinal, a fim de conferir proteção contra a infecção, prevenindo a ligação viral com os enterócitos ou inativando o vírus. Entretanto, parece não fazer diferença o tipo de anticorpo presente, seja IgA ou IgG, contanto que sua produção seja induzida em magnitude grande o suficiente na superfície da mucosa entérica (Jiang et al., 2002).

O desenvolvimento da imunidade homotípica versus a heterotípica após a infecção natural (ou vacinação) é um fenômeno complexo e ainda não foi completamente elucidado (Ward et al., 2010). Diversos estudos relatam a ocorrência de reinfecções pelos mesmos genótipos G ou P. Esses estudos dão suporte a hipótese de que as infecções naturais por RVA realmente produzem uma proteção incompleta (O´Ryan et al., 1994). Como citado anteriormente, o hospedeiro pode sofrer várias infecções por RVA durante a vida. Infecções repetidas por RVA induzem ambas as respostas, homotípica e heterotípica (Parashar et al., 1998), sendo a presença de anticorpos séricos um componente crítico no mecanismo de defesa do hospedeiro e proteção contra a diarreia por RVA (Jiang et al., 2002). Entre as possibilidades na indução da resposta heterotípica estão a produção de anticorpos protetores contra

epítomos heterotípicos presentes na VP4 ou VP7, ação protetora dos anticorpos contra antígenos comuns presentes na VP6 ou NSP1, ou ainda, reação cruzada protetora das células T (Angel et al., 2012).

Considerando que a presença de anticorpos no intestino delgado no momento de exposição ao RVA é fundamental para a prevenção da infecção, a presença desses anticorpos neutralizantes no colostro ou leite materno também deve ser importante (Molyneaux, 1995). Embora anticorpos sorotipo-específicos tenham sido detectados no leite materno, a função do aleitamento na proteção contra a gastroenterite infantil ainda requer estudos adicionais (Kapikian et al., 2001). Assim, a imunidade passiva que ocorre pela transferência de anticorpos através da placenta durante a gravidez e no período de aleitamento parece proteger os neonatos da infecção por RVA (Yolken et al., 1985; Offit e Clark, 1995). Entretanto, alguns estudos também demonstraram que não há proteção contra a infecção por RVA através da amamentação (Clemens et al., 1993). É importante ressaltar que existem fatores de confundimento (confundidor ou de confusão) nos estudos que analisam a relação entre infecção por RVA e aleitamento materno, tais como classe social e mães fumantes, além da presença de inibidores de tripsina no leite materno (Molyneaux, 1995).

De modo interessante, a imunidade passiva conferida aos primatas, roedores e coelhos neonatos não é observada em outros animais recém-nascidos, onde o pico de susceptibilidade à infecção por RVA ocorre nos primeiros dias de vida, seguido de um rápido desenvolvimento de imunidade (Molyneaux, 1995; Saif e Fernandez, 1996). Nos ungulados (animais de cascos), como porcos e bezerros, a estrutura da placenta não permite a transferência de anticorpos via intrauterina (Snodgrass e Browning, 1993; Saif e Fernandez, 1996). Estes animais nascem desprovidos de imunoglobulinas e as adquirem unicamente através da ingestão de colostro em até 48 horas após o nascimento (Saif e Fernandez, 1996; Parreño et al., 2004). Essa condição também foi observada em um estudo realizado com carneiros gnotobióticos recém-nascidos (Snodgrass e Wells, 1976).

Outra peculiaridade baseia-se no fato de que a imunoglobulina predominante no leite de ruminantes é do tipo IgG, enquanto em humanos e suínos a principal imunoglobulina secretada nesse fluido é a IgA. A IgA é produzida localmente dentro

das glândulas mamárias por células oriundas do intestino e garante que os neonatos recebam anticorpos capazes de protegê-los contra patógenos entéricos endêmicos na população. Entretanto, apenas uma pequena porção dessas IgA consegue ser absorvida pelo sangue. O conhecimento dessas diferenças pode ser útil para o desenvolvimento de vacinas e estratégias de imunizações passivas (Saif e Fernandez, 1996; Parreño et al., 2004).

1.8.3 Diagnóstico dos rotavírus do grupo A

A detecção de RVA pode ser realizada empregando-se diversas metodologias: (i) isolamento viral utilizando células primárias das linhagens celulares AGMK (células de rim macaco verde africano - *African Green Monkey Kidney cells*), MA-104 (células de linhagem de rim fetal de macaco Rhesus), MDBK (*Madin and Darby Bovine Kidney cells*) e PK-15 (células de rim suíno) (Ward et al., 1984; Aboudy et al., 1989); (ii) microscopia eletrônica; (iii) eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA); (iv) ensaios imunoenzimáticos (EIAs); (v) *dot-immunoblotting*; (vi) teste de imunofluorescência; (vii) teste de imunoperoxidase; (viii) hemaglutinação passiva; (ix) teste de aglutinação em látex e (x) hibridização *dot blot* (Chauhan e Singh, 1996; Murphy et al., 1999; Malik et al., 2005; Dhama et al., 2009).

Atualmente, tanto o diagnóstico quanto a tipagem molecular dos RVA é realizada utilizando transcrição reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR); *nested/multiplex* RT-PCR e; Polimorfismo de Fragmentos de DNA/RNA obtidos por Enzimas de Restrição (*Restriction Fragment Length Polymorphism – RFLP*) (Alfieri et al., 2004; Steele et al., 2004). Métodos de sequenciamento genético, hibridização RNA-RNA e *microarray*, bastante sensíveis e capazes de discriminar infecções mistas por RVA, também estão sendo desenvolvidos e empregados (Dhama et al., 2009).

O método de diagnóstico laboratorial mais amplamente utilizado é o EIA, o qual detecta o antígeno de grupo dos RVA (VP6) diretamente nas fezes (Cortese e Parashar, 2009). RVA é excretado em grande quantidade pelas fezes durante os episódios de diarreia e pode ser detectado por EIA até uma semana após a infecção

ou, até 30 dias, no caso de pacientes imunocomprometidos (Parashar et al., 1998). Diversos kits comerciais de EIA estão disponíveis no mercado. Esses kits são rápidos, altamente sensíveis e fáceis de utilizar, tornando-os muito apropriados para o diagnóstico clínico e vigilância dos RVA (Cortese e Parashar, 2009).

1.8.4 Epidemiologia dos rotavírus do grupo A

A infecção por RVA é ubíqua, afetando humanos e animais de todas as idades (de Castro et al., 1994; Timenetsky et al., 1996; Parashar et al., 1998). Cerca de 95% das crianças em todo o mundo sofrem infecção por RVA entre 3 e 5 anos de idade (Parashar et al., 1998). RVA é a causa mais comum de diarreia em crianças <3 anos ao redor do mundo, atingindo pico de incidência entre crianças nas idades de 4 a 36 meses, as quais são mais susceptíveis a hospitalizações, principalmente devido à desidratação (Gouvea et al., 1991; Parashar et al., 1998); além do significativo impacto econômico (Afonso e Antunes, 2007). RVA é a principal causa de mortalidade e morbidade relacionada à diarreia na América Latina e Caribe, onde se estima que ocorra 8.000 mortes em <5 anos anualmente (Tate et al., 2012).

Infecções em neonatos são frequentemente assintomáticas, provavelmente devido à transferência passiva de anticorpos maternos. Quando ocorrem infecções sintomáticas em neonatos, geralmente estão associadas a cepas não usuais de RVA (Parashar et al., 1998). As infecções sintomáticas acometem principalmente crianças na faixa etária de 6 meses a 2 anos de idade, e o RVA é um dos principais patógenos envolvidos em surtos de diarreia nosocomial em creches e pré-escolas (de Castro et al., 1994; Timenetsky et al., 1996; Timenetsky et al., 2004; Leung et al., 2005).

Infecções por RVA em adultos são geralmente assintomáticas ou subclínicas devido à presença de anticorpos neutralizantes, os quais foram adquiridos durante infecções naturais primárias e/ou secundárias. Quando a doença diarreica acomete jovens e adultos, geralmente, está associada a surtos esporádicos em ambientes fechados como escolas, locais de trabalho e hospitais. Ocasionalmente, o RVA pode causar doença nos pais de crianças doentes, imunocomprometidos (incluindo aqueles pacientes com HIV), idosos e viajantes (de Castro et al., 1994; Timenetsky et al., 1996;

Parashar et al., 1998; Timenetsky et al., 2004; Leung et al., 2005; Morillo et al., 2010a).

Uma característica chave na epidemiologia dos RVA é o seu padrão marcadamente sazonal (Turcios et al., 2006), entretanto, o(s) mecanismo(s) responsável(s) por esse padrão de sazonalidade ainda não está(ão) claro(s) (e.g. umidade relativa, temperatura média, densidade populacional) (Parashar et al., 1998; Greenberg e Estes, 2009). Em climas temperados, a infecção por RVA ocorre nos meses mais frios e secos do ano (outono e inverno) e, em climas tropicais, as taxas tendem a ser igualmente distribuídas ao longo do ano (Parashar et al., 1998; Greenberg e Estes, 2009).

Por outro lado, uma revisão sistemática conduzida por Levy et al. (2009) demonstrou que um maior número de infecções por RVA também ocorre nos meses mais frios e secos do ano mesmo em países tropicais. No Brasil, a sazonalidade do RVA é variável, com aumento de incidência entre os meses de maio a setembro (período mais frio e seco) nos Estados das regiões Central, Sul e Sudeste. Nas regiões Norte e Nordeste do país, a ocorrência de RVA se distribui de maneira uniforme durante o ano todo (Pereira et al., 1993).

A vigilância epidemiológica intensiva e continuada de RVA é realizada no Brasil desde a década de 80, quando foi implantada uma rede de laboratórios em oito Estados (Goiás, Santa Catarina, São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Pernambuco, Maranhão e Pará) e no Distrito Federal (Timenetsky et al., 1993; Timenetsky et al., 1996; Timenetsky et al., 2004).

Nos animais, a infecção por RVA é a principal causa de diarreia em gado em todo o mundo (Saif et al., 1994). Bezerros são bastante susceptíveis a infecção por RVA nas 2-3 primeiras semanas de idade (Murphy et al., 1999; Steele et al., 2004; Dhama et al., 2009), resultando em perdas econômicas significativas relacionadas aos custos de tratamento e redução no ganho de peso dos animais (Saif et al., 1994). Após os 3 meses de idade, os bezerros, geralmente, não são mais infectados (Dodet et al., 1997). Entretanto, em bezerros de búfalos, a infecção por RVA é observada até os 6 meses de idade (Muniappa et al., 1987). Segundo a literatura internacional, a incidência e prevalência da infecção por RVA em bezerros apresentam-se de forma inconstante, variando de 7% em Bangladesh (Selim et al., 1991) a 98% nos EUA (Schlafer e Scott,

1979), com média de 30-40% (Dhama et al., 2009). Vale ressaltar, que esses estudos foram conduzidos em diferentes países, sob diferentes condições ambientais e epidemiológicas, além da utilização de distintos métodos (e.g. EGPA, ELISA, RT-PCR). A mortalidade em bezerros devido à infecção por RVA pode chegar a 80%, entretanto, a maioria dos estudos reporta uma taxa de mortalidade variando de 5 a 20% (Chauhan e Singh, 1996; Dhama et al., 2009).

Em equinos, a gastroenterite causada por RVA representa um grande desafio para os profissionais que estão envolvidos nos programas de melhoramento intensivo de cavalos (Dhama et al., 2009). RVA são a principal causa de diarreia em potros até 3 meses de idade, causando graves perdas econômicas devido à morbi-mortalidade (Conner e Darlington, 1980).

Os suínos também sofrem com a diarreia associada aos RV (Will et al., 1994; Dhama et al., 2009). A infecção por RV é comumente observada em leitões desmamados e com 1-8 semanas de vida (Saif et al., 1994; Dhama et al., 2009). A diarreia associada à RV em suínos parece ter distribuição global (Teodorff et al., 2005; Dhama et al., 2009) e pode ser causada por diferentes grupos: RVA, RVB, RVC e RVE (Dhama et al., 2009). Entretanto, o RVA é o mais prevalente (Martella et al., 2007a; Dhama et al., 2009). Os suínos também são comumente afetados por outros vírus causadores de diarreia, tais como coronavírus e astrovírus e, dessa forma, a investigação de gastroenterite associada à RVA é considerada como diagnóstico diferencial (Holland, 1990; Dhama et al., 2009). Em leitões >1 mês de idade e na idade adulta, o RVA raramente causa doença clínica (Dhama et al., 2009).

Em ovinos, o RVA é reconhecido por causar diarreia principalmente em cordeiros (Wani et al., 2004). A diarreia causada por RVA em caprinos entre 2-3 dias de vida é amplamente reportada (Mendes et al., 1994; Dhama et al., 2009). Animais de estimação, como cães e gatos, também sofrem com diarreia causada por RVA, entretanto há poucos relatos, provavelmente devido à ocorrência de infecções subclínicas (Dhama et al., 2009).

Infecção por RV também é a principal causa de gastroenterite em diversas espécies de aves, incluindo galinhas, perus, faisões, perdizes e pombos (Legrottaglie et al., 1997; Battilani et al., 2003; Silva et al., 2012; Asano et al., 2011). Recentemente, foi

sugerido que a infecção por RV pode causar a Síndrome de Perda de Peso e Nanismo (*Runting and Stunting Syndrome*) em aves (Otto et al., 2006). Classicamente os grupos RVD, RVF e RVG estão associados à gastroenterite em aves, entretanto o RVA é considerado o grupo de maior importância epidemiológica (Villarreal et al., 2006). Em contraste ao que ocorre com os outros animais, aves adultas também são susceptíveis à infecções por RVA. Ainda, perus parecem ser mais predispostos à infecção do que frangos (Yason e Schat, 1987).

1.8.5 Distribuição das cepas de rotavírus do grupo A

A diferenciação das cepas de RVA determinada pela combinação dos tipos G e P é amplamente utilizada em estudos epidemiológicos (Kapikian et al., 2001), onde genótipos e sorotipos são peculiarmente distribuídos entre as várias espécies animais (Martella et al., 2010). Devido à característica segmentada do genoma dos RV, os genes que codificam para VP7 e VP4 podem, em teoria, segregar-se de forma independente, acarretando em uma diversidade sorotípica bastante grande (Greenberg e Estes, 2009). As combinações G1P[8], G2P[4], G3P[8] e G4P[8] são consideradas, historicamente, como as mais prevalentes em humanos em todo o mundo. Entretanto, no decorrer dos últimos 10 anos, cepas G9 foram frequentemente detectadas e, geralmente, associadas a P[8]. Dessa forma, atualmente, G9P[8] é considerado o quinto genótipo mais prevalente em humanos (Timenetsky et al., 1996; Santos e Hoshino, 2005; Carmona et al., 2006; Matthijnssens et al., 2008b; Parra, 2009; Morillo et al., 2010a; Morillo et al., 2010b; Cilli et al., 2011; Patton, 2012).

Diversos estudos indicam que a predominância dos genótipos de RVA na população humana varia com o tempo. Uma determinada cepa dominante por um ou dois anos pode ser substituída por outra cepa emergente (Beards et al., 1989; Linhares et al., 1989; Gomez et al., 1990; Carmona et al., 2006; Parra, 2009). Recentemente, G12 foi reconhecido como um genótipo emergente e parece estar se expandindo globalmente (Rahman et al., 2007). Outras cepas podem ser periodicamente ou localmente importantes como G5P[8] no Brasil durante a década de 80 (Gouvea et al., 1994a; Timenetsky et al., 1997) e o G8 na África (Cunliffe et al., 2001).

A partir do ano de 2007, observou-se no Brasil um aumento na detecção de G2P[4] (Gurgel et al., 2008; Morillo et al., 2010a; Cilli et al., 2011). Alguns autores sugeriram que essa prevalência estaria associada a pressão vacinal, onde a introdução de uma vacina monovalente G1P[8] poderia ter criado condições para que a cepa G2P[4] adquirisse vantagens sobre as demais (que compartilham o genótipo P[8]) na competição pela infecção de hospedeiros susceptíveis (Gurgel et al., 2008). Por outro lado, a periodicidade temporal na circulação de genótipos de RVA é fato documentado. No Brasil, G2P[4] apresenta um padrão cíclico de ~10 anos (Carmona et al., 2006), o qual deve ser considerado como uma explicação alternativa para o aumento na detecção de G2P[4] após 2007 (Morillo et al., 2010a; Cilli et al., 2011). Uma elevada frequência de detecção de G2P[4] também é observada em populações não vacinadas da Europa e da América do Sul, sugerindo ser realmente um evento decorrente da flutuação normal dos genótipos de RVA circulantes (Desselberger et al., 2006; Ferrera et al., 2007; Antunes et al., 2009).

As mudanças sazonais das cepas predominantes de RVA em uma determinada região geográfica e sua migração devido aos movimentos populacionais são estudadas extensivamente (Parra, 2009); entretanto, a base epidemiológica da ciclagem genotípica observada nos RVA ainda não está clara (Patton, 2012). Acredita-se que a troca sazonal de cepas de RVA possa ser um mecanismo utilizado pelo vírus para escapar da imunidade de grupo adquirida através de infecções anteriores e, dessa forma, persistir na população humana (Parra, 2009).

Nos países desenvolvidos, as cepas G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8] e G9P[8] (mais comuns mundialmente) são detectadas em aproximadamente 100% das infecções causadas por RVA. Nos países em desenvolvimento, além das cepas comumente detectadas, combinações incomuns de RVA (geralmente devido a rearranjos com cepas animais) também são detectadas e exibem ampla variação de uma região para outra. Um programa de vigilância conduzido pela WHO em 2010 evidenciou que as cepas incomuns mais predominantes eram: G12P[8] e G12P[6] no sudeste asiático; G2P[6], G3P[6] e G1P[6] na África Sub-Saariana; G1P[4] e G2P[8] no Pacífico Oeste e G9P[4] nas Américas (WHO, 2011; Patton, 2012).

Existe uma grande variedade de cepas de RVA circulante nos animais. Os

genótipos G3, G5, G10 e G14 são comumente encontrados em equinos, sendo que a maioria das cepas pertencentes aos genótipos G3 e G14 estão associadas a P[12] (Tsunemitsu et al., 2001; Dhama et al., 2009; Matthijnssens et al., 2012). Ainda, genótipos atípicos também foram identificados, como G13P[18] em 1991 no Reino Unido (Browning et al., 1991) e G16 entre 2003-2005 na Índia (Gulati et al., 2007; Matthijnssens et al., 2012). Algumas cepas de origem bovina (e.g. G8P[1], G10 P[11]), felina (e.g. G3P[3]) e porcina (e.g. G5P[7]) também já foram detectadas em cavalos (Matthijnssens et al., 2012) (Tabela 3).

Os RVA que infectam bovinos estão relacionados aos genótipos G1, G6-G8, G10, G11, G15, G18 e G21 e, P[1], P[5], P[11], P[14], P[17], P[21] e P[29]; sendo G6, G8 e G10 associados a P[5], P[11] e P[1], os mais prevalentes (Ciarlet et al., 1997c; Alfieri et al., 2004; Steele et al., 2004; Dhama et al., 2009; Badaracco et al., 2012). G6 é frequentemente detectado em gado de corte e G10 em rebanho leiteiro. Na Índia, G10 é mais prevalente que G6, provavelmente devido à peculiaridade de sua associação com gado leiteiro (Varshney et al., 2002). Recentemente, novos genótipos, como G3 e G5, foram isolados em bovinos (Ghosh et al., 2007a; Dhama et al., 2009; Badaracco et al., 2012). De modo muito interessante, da mesma forma que ocorre em humanos, também foram observadas variações cíclicas nos genótipos detectados em bovinos no Japão: G10 (1995), G8 (1996) e G6 (1997) (Fukai et al., 2002) (Tabela 3).

Inúmeros genótipos já foram descritos em suínos: G1-G6, G8-G12, P[1], P[5-8], P[11], P[13], P[19], P[21-27] e P[32] (Miyazaki et al., 2011). Os genótipos G9P[13] e G9P[23] são mais prevalentes em porcos jovens, principalmente no Japão (Teodoroff et al., 2005). As cepas de RVA isoladas em cordeiros pertencem aos genótipos G1, G3, G5, G6, G8, G9 e G10, sendo que os genótipos G3, G6 e G10 encontram-se comumente associados aos tipos P pertencentes à P[1], P[11] e P[14] (Holland, 1990; Dhama et al., 2009). Em caprinos, o genótipo mais comum é o G6P[5] (Dhama et al., 2009), entretanto outras cepas também já foram descritas: G3P[3] na Coreia do Sul (Lee et al., 2003), G6P[14] na África do Sul (Ghosh et al., 2010) e G6P[1] na Itália (Pratelli et al., 1999) (Tabela 3).

Em animais domésticos, o genótipo G3 é o mais prevalente, sendo mais comumente associado a P[3] e P[5] em cães, e a P[3] e P[9] em gatos (Martella et al.,

2001; Kang et al., 2007; Tsugawa e Hoshino, 2008; Dhama et al., 2009; Martella et al., 2011). Ainda, G3 também é frequentemente detectado em coelhos, embora associado a P[22] e P[14] (Martella et al., 2005). Existem informações limitadas quanto aos genótipos circulantes em aves e os trabalhos reportam a detecção de G7 (McNulty, 2003), G23 (Ursu et al., 2009; Trojnar et al., 2013), G22 (Trojnar et al., 2013), G6 (Asano et al., 2011; Silva et al., 2012), G10 (Silva et al., 2012) e P[37] (Trojnar et al., 2013). Entretanto, RVA detectado em aves parece ser geneticamente heterogêneo quando comparado ao de mamíferos (Ito et al., 2001; Matthijssens et al., 2008a). A transmissão interespecie também é aventada para aves, uma vez que genótipos de origem bovina (e.g. G6 e G10) já foram identificados em tais animais (Asano et al., 2011; Silva et al., 2012) (Tabela 3).

Os genótipos de RVA que circulam em animais selvagens são praticamente desconhecidos. Existem relatos de detecção de G3P[9] em guaxinins (*Nyctereutes larvata*) e ocelotes mascarados (*Paguma larvata*) no Japão (Abe et al., 2010); G25P[6] em morcegos da fruta (*Eidolon helvum*) no Kênia (Esona et al., 2010a); G8P[14] em vicunhas (*Vicugna vicugna*) na Argentina (Badaracco et al., 2013); G1P[7] em um panda gigante na China (Guo et al., 2013); G3P[3] em morcego-de-ferradura (*Rhinolophus hipposideros*) na China (He et al., 2013); G9P[23], G4P[23], G9P[13] e G4P[6] em javalis (*Sus scrofa*) no Japão (Okadera et al., 2013) e G10P[11] em uma girafa do zoológico de Dublin, Irlanda (O'Shea et al., 2014). Entretanto, ainda não é possível concluir se esses animais são comumente infectados por esses genótipos ou se são resultantes de transmissões interespecie e/ou rearranjos gênicos (Tabela 3).

Tabela 3. Resumo da distribuição das cepas de RVA que comumente infectam animais.

Animal	Genótipo G	Genótipo P
Equínos	G3; G14	P[12]
Bovinos	G6; G8; G10	P[1]; P[5]; P[11]
Suínos	G9	P[23]
Ovinos	G3; G6; G10	P[1]; P[11]; P[14]
Caprinos	G6	P[5]
Caninos	G3	P[3]; P[5]
Felinos	G3	P[3]; P[9]
Leporídeos (coelho)	G3	P[14]; P[22]
Aves	G6; G7; G10; G22; G23	P[37]
Procionídeos (guaxinim)	G8	P[9]
Quirópteros (morcego)	G3; G25	P[3]; P[6]
Ursídeos (Panda Gigante)	G1	P[7]
Suínos selvagens (javalis)	G4; G9	P[6]; P[13]; P[23]
Artiodactilos (vicunha e girafa)	G8; G10	P[11]; P[14]

1.8.6 Manifestações clínicas do rotavírus do grupo A

A infecção por RVA pode resultar em um quadro sintomático ou assintomático, dependendo tanto de fatores virais quanto do hospedeiro (e.g. idade ou *status* nutricional) (Greenberg e Estes, 2009). O período de incubação estimado é de aproximadamente 48 horas (Davidson et al., 1975). Em condições experimentais, adultos inoculados oralmente com RVA, apresentaram sintomas entre 1 e 4 dias (Kapikian et al., 1983). Os episódios de diarreia podem variar de um quadro leve, com diarreia líquida e duração limitada a quadros graves com febre, vômitos, desidratação, desequilíbrio eletrolítico, choque e morte (de Castro et al., 1994; Timenetsky et al., 1996; Timenetsky et al., 2004; Leung et al., 2005).

A manifestação da doença geralmente se inicia com febre (>39°C) e vômito e, após 24-48 horas, diarreia aquosa (Cortese et al., 2009). Os episódios de vômito têm durações inferiores a 24 horas e os demais problemas gastrointestinais se resolvem em 3-7 dias (Cortese et al., 2009). A desidratação é uma complicação frequente, devido à gravidade da diarreia associado aos episódios de vômitos (Leung et al., 2005). A

terapia de reidratação oral (TRO) e/ou intravenosa (TRI) para manutenção do equilíbrio osmótico e de eletrólitos permanece como base no tratamento das infecções por RVA (Timenetsky et al., 2004; Leung et al., 2005).

Crianças e adultos imunocomprometidos (e.g. imunodeficiência congênita, transplantes de órgãos) infectados por RVA podem apresentar gastroenterite prolongada (Cortese et al., 2009) e parece não haver diferença quanto à gravidade da doença diarreica entre crianças infectadas ou não com o vírus HIV (Steele et al., 2009), inclusive no Brasil (Morillo et al., 2010a).

Não existem antivirais específicos contra a infecção por RVA, contudo novos medicamentos que possam atuar na redução da gravidade e duração da doença diarreica estão sendo investigados. Rossignol e El-Gohary (2006) demonstraram que a Nitazoxanida (comercializado no Brasil como Annita[®]) pode desempenhar um papel importante no controle da gastroenterite viral em adultos, exibindo melhor efetividade contra RVA quando comparado a outros enteropatógenos virais. Kim et al. (2012) evidenciou que análogos da triacsina C podem agir como antivirais potentes no combate à infecção por RVA.

Recentemente, plantas medicinais brasileiras provenientes do cerrado do Estado de Minas Gerais, tradicionalmente utilizadas para o tratamento de diarreia, foram testadas quanto às suas possíveis atividades antivirais contra o RVA sítio SA11 *in vitro*. Entre as espécies estudadas, *Byrsonima verbascifolia*, *Eugenia dysenterica*, *Hymenaea courbaril* e *Myracrodruon urundeuva* apresentaram atividade antiviral potencial contra RVA (Cecílio et al., 2012).

Nos bezerros, a diarreia por RVA apresenta um período de incubação curto variando de 12 a 24 horas e, em alguns casos, de 18 a 96 horas (Chauhan e Singh, 1996; Steele et al., 2004). Geralmente, não se manifesta como doença febril, a não ser que haja complicações devido à associação com outros patógenos (Dhama et al., 2009). Os bezerros infectados apresentam diarreia grave, desidratação e inapetência, além da relutância em se movimentar (Murphy et al., 1999; Dhama et al., 2009). As fezes não apresentam sangue ou muco (Steele et al., 2004), contudo episódios seguidos de diarreia dificultam a recuperação do animal e podem ocasionar morte devido por desidratação grave (Murphy et al., 1999; Dhama et al., 2009). Bezerros

recém-nascidos, devido a menor quantidade de reserva de fluidos corporais, são mais vulneráveis à morte por desidratação (Murphy et al., 1999; Dhama et al., 2009).

A gravidade da doença em bezerros pode ser influenciada por diversos fatores: pouca ingestão de colostro, idade, *status* imune do rebanho, grau de exposição ao vírus, virulência da cepa e a presença de patógenos secundários associados (Chauhan e Singh, 1996; Steele et al., 2004; Dhama et al., 2009). Ainda, a gravidade da doença também pode ser modulada pelo grau de desidratação do animal, condições de limpeza do ambiente, variações de temperatura e densidade populacional (Chauhan e Singh, 1996; Dhama et al., 2009). De modo interessante, o principal fator de estresse que potencializa a gravidade da infecção por RVA em bovinos parece ser o clima frio e as flutuações drásticas de temperatura entre dia e noite (Chauhan e Singh, 1996). O emprego de antibióticos no controle das infecções bacterianas secundárias e a terapia de reposição de fluidos e eletrólitos diminuem a taxa de mortalidade entre bezerros (Murphy et al., 1999; Steele et al., 2004).

A infecção por RVA em suínos ocorre em indivíduos de todas as idades, entretanto é mais comum em porcos <1 semana de idade e entre 3 a 6 semanas. Em hospedeiros susceptíveis, o RVA tem um período curto de incubação e, geralmente, causa infecção aguda, caracterizada por diarreia súbita, anorexia, depressão do sistema nervoso central e, ocasionalmente, vômito. Leitões desmamados apresentam quadro de gastroenterite mais aguda e maior taxa de mortalidade quando comparados a animais mais jovens. O agravamento do quadro diarreico e aumento da mortalidade nessa faixa etária, provavelmente, são decorrentes da diminuição da imunidade conferida pelo aleitamento materno, aumento do estresse devido a mudança nutricional, desmame, local de acomodação e infecções mistas de RVA com outros microorganismos (Holland, 1990; Dhama et al., 2009). RVA também é conhecido por causar diarreia aguda acompanhada de desidratação, anorexia e prostração em caprinos neonatos (Munoz et al., 1995; Dhama et al., 2009).

Considerando os animais domésticos, cães adultos e filhotes <3 meses de idade são geralmente assintomáticos durante infecção por RVA (Kang et al., 2007; Dhama et al., 2009). A infecção em filhotes pode promover diarreia aguda em 20-24 horas após o contágio. Recomenda-se que filhotes infectados por RVA recebam terapia de reposição

de fluidos, visando prevenir a desidratação causada pela diarreia (Dhama et al., 2009). RVA pode causar tanto infecções sintomáticas quanto assintomáticas em gatos. A diarreia em felinos é leve e transitória, geralmente observada em filhotes, entretanto sua gravidade pode ser maior quando associado a infecções secundárias (Dhama et al., 2009).

Nas aves domésticas, tanto em aves de corte (*broiler birds*) quanto em produtoras de ovos (*layer birds*), RVA é um patógeno que provoca diarreia, desidratação, anorexia, perda de peso e má absorção de nutrientes, acarretando em consideráveis perdas econômicas (Villarreal et al., 2006; Dhama et al., 2009). Para o controle da infecção em aves é necessário verificar a ocorrência de gastroenterite secundária causada por bactérias, pois a utilização de antimicrobianos é essencial, além de controlar a desidratação através de reposição de fluidos e terapia eletrolítica (Dhama et al., 2009).

1.8.7 Prevenção contra infecção por rotavírus do grupo A

Os RVA são muito resistentes a vários métodos comuns de desinfecção, dificultando a implementação de medidas preventivas adequadas (Dhama et al., 2009). Normas de higiene também parecem ter pouco efeito sobre a redução das taxas de infecção por RVA (Leung et al., 2005). Ainda, RVA são excretados em altas concentrações (10^{12} partículas virais/grama de fezes durante a infecção aguda) nas fezes de crianças infectadas, vários dias antes e após a manifestação clínica da doença (Bishop, 1996).

Mundialmente, a prevenção efetiva da diarreia causada por RVA nos bezerros é gerenciada através de boas práticas de manejo e higiene, associada à vacinação do rebanho semanas antes do nascimento da prole (Steele et al., 2004, Dhama et al., 2009). A ingestão de colostro artificial (contendo imunoglobulinas contra RVA), soro de leite e óleos vegetais pelos bezerros são estratégias alternativas de prevenção (Murakami et al., 1986; Dhama et al., 2009). Existem relatos de que ovos de galinha contendo imunoglobulinas podem ser eficientes na proteção de bezerros recém-nascidos contra a infecção por RVA (Dhama et al., 2009). Recentemente foi descrito

que a ingestão de um ovo hiperimune por dia por bezerros neonatos é capaz de reduzir a gravidade da doença diarreica causada por RVA (Bilbao et al., 2006). Ainda, a suplementação com pró-bióticos também pode prevenir a diarreia causada por RVA em bezerros jovens (Gill e Prasad, 2008).

Em equinos foi observado que a alimentação dos potros com colostro bovino rico em imunoglobulinas contra RVA por 3-5 dias reduziu a morbidade da doença (Watanabe et al., 1993). Estratégias profiláticas efetivas, quarentenas, desinfecção e condições de higiene rigorosas são essenciais para a prevenção de diarreia em potros (Dhama et al., 2009). Para uma prevenção efetiva da diarreia causada por RVA em suínos, os fatores de estresse ambiental devem ser reduzidos ao mínimo (Holland, 1990), assim como a execução constante de procedimentos de limpeza e desinfecção dos chiqueiros, uma vez que o RVA apresenta elevada resistência ambiental (Dhama et al., 2009).

Estudos sobre os genes que codificam para proteínas associadas à virulência, tal como a NSP4, são extremamente necessários (Kuzuya et al., 2007), uma vez que podem oferecer novas e importantes abordagens na prevenção da doença diarreica por RVA tanto em humanos quanto em animais (Ball et al., 1996; Dhama et al., 2009).

1.8.7.1 Vacinas contra rotavírus do grupo A

Nos humanos, a doença diarreica grave pode ser efetivamente controlada através da vacinação universal contra o RVA (Leung et al., 2005). Pesquisas para o desenvolvimento de vacinas foram iniciadas em meados da década de 70, quando investigadores demonstraram em animais de laboratório que a infecção prévia por RVA de origem animal era capaz de protegê-los contra infecções causadas por RVA de origem humana (Dennehy, 2008). Supunha-se que as cepas animais eram naturalmente atenuadas para os humanos quando administradas oralmente e, talvez, pudessem mimetizar a infecção natural e conferir proteção imunológica contra a doença em crianças (Kang, 2006; Dennehy, 2008).

Três vacinas com RVA animal de 1ª geração foram avaliadas, sendo 2 bovinas (RIT₄₂₃₇ - G6P6[1] e WC3 - G6P7[5]) e uma símia (*Rhesus*) (RRV - G3P[3]), as quais

apresentaram eficácia variada nos testes clínicos. Em 2000-2001, a China introduziu a vacina oral LLR em seu Programa Nacional de Imunização. Esta vacina é composta por uma cepa atenuada monovalente G10P[12] derivada de um RVA isolado em cordeiro e foi desenvolvida e produzida pelo *Lanzhou Institute of Biologicals Products*. A eficácia dessa vacina não é conhecida, uma vez que não foi testada contra placebo em testes clínicos controlados na fase III (Kang, 2006; Dennehy, 2008).

A inconsistência na proteção conferida por essas vacinas monovalentes utilizando apenas cepas de origem animal, fez com que os esforços se concentrassem no desenvolvimento de vacinas que utilizassem rearranjos naturais entre RVA de origem humana e animal. As vacinas de 2ª geração foram formuladas de maneira que o segmento gênico que codifica para a proteína VP7 de origem humana fosse combinado com outros 10 segmentos de origem animal. Em seguida, houve a inclusão de mais de um genótipo G nos rearranjos, visando tanto a proteção homotípica quanto heterotípica. Essas vacinas combinadas foram denominadas “*modified Jennerian*” (Kang, 2006; Dennehy, 2008; Cortese et al., 2009).

Finalmente, em agosto de 1998, o *Advisory Committee on Immunization Practices* (ACIP) recomendou o uso da vacina Rotashield® (RRV-T) (Wyeth Lederle Vaccines and Pediatrics, Marietta, Pennsylvania) em crianças nos EUA (Cortese et al., 2009). Essa foi a primeira vacina oral atenuada combinada multivalente desenvolvida (Dennehy, 2008). A Rotashield® é composta pelos genótipos G1, G2 e G4 de origem humana e G3 de origem símia (*Rhesus*) (RRV); administrada em 3 doses aos 2, 4 e 6 meses de idade (CDC, 1999; Dennehy, 2008; Cortese et al., 2009). Nos ensaios clínicos realizados nos EUA, Finlândia e Venezuela, a RRV-TV se mostrou altamente eficaz, diminuindo significativamente a doença diarreica aguda causada por RVA em 80-100% dos casos (Kang, 2006; Dennehy, 2008). Entretanto, após apenas 14 meses de aplicação, esta vacina foi retirada do mercado americano (em outubro de 1999) devido a sua suposta associação com casos de intussuscepção (Dennehy, 2008).

A intussuscepção ou invaginação intestinal é uma condição em que um segmento do intestino invagina-se no segmento imediatamente seguinte. A incidência real desse evento adverso é muito difícil de ser avaliado e um grupo internacional de pesquisadores sugeriu um risco de 1 a cada 10.000 crianças vacinadas (Kang, 2006;

Dennehy, 2008). Por esse motivo, embora a RRV-TV continue licenciada nos EUA, ela não foi testada ou licenciada em nenhum outro país (Dennehy, 2008; Cortese e Parashar, 2009).

As supostas complicações associadas ao uso da Rotashield[®], fez com que o *Global Advisory Committee on Vaccine Safety (GACVS)* orientasse a inclusão da avaliação de risco de intussuscepção no desenvolvimento de novas vacinas contra RVA (Cortese et al., 2009). Atualmente, existem duas vacinas licenciadas e recomendadas pela WHO, as quais se mostraram seguras e eficientes (CDC, 2011). A RotaTeq[®] (RV5) (Merck & Co. Inc., West Point, Pennsylvania) é uma vacina oral atenuada pentavalente que contém cinco genótipos virais humanos e bovinos, G1 a G4 + P[8], combinados através de rearranjos (*reassortants*) (Heaton e Ciarlet, 2007; Matthijssens et al., 2010a; CDC, 2011). A RotaTeq[®] deve ser administrada em 3 doses em crianças entre 1 e 2 meses de idade, sendo a 1^a dose entre 6 a 12 semanas, a 2^a dose entre 4 e 10 semanas após a 1^a dose e, a 3^a dose de 4 a 10 semanas após a 2^a dose, entretanto esta última dose não pode ultrapassar as 32 semanas de idade da criança (Dennehy, 2008; CDC, 2011).

A Rotarix[®] (RIX₄₄₁₄) (GlaxoSmithKline Biologicals, Rixensart, Bélgica) é uma vacina oral atenuada monovalente composta pela cepa G1P1A[8], o qual representa o genótipo humano mais comum de RVA (Ruiz-Palácios et al., 2006; CDC, 2011). Duas doses de aplicação de Rotarix[®] são recomendadas, sendo a 1^a aos 2 meses e a 2^a aos 4 meses de idade (Dennehy, 2008; Cortese et al., 2009). Em 2006, a vacina Rotarix[®] foi incluída no PNI, prevenindo gastroenterite grave e induzindo uma redução significativa na frequência de detecção de RVA em crianças com gastroenterite (Gurgel et al., 2008). A RotaTeq[®] também está licenciada no Brasil e disponível apenas nas redes particulares de vacinação.

Após a implantação da vacinação universal contra RVA, sistemas de vigilância foram estabelecidos no Brasil e no mundo, os quais precisam ser sensíveis e específicos a fim de documentarem a efetividade dos programas de imunização vigentes (Cortese et al., 2009; Morillo et al., 2010b). Laboratórios sentinelas monitoram a circulação das cepas de RVA, antes e depois da introdução vacinal, visando detectar tipos G(s) e P(s) raros não incluídos nas vacinas comercializadas e/ou vacinas

candidatas (atualmente em ensaios clínicos) (Cortese et al., 2009; Morillo et al., 2010b; Cilli et al., 2011). A vigilância dos genótipos de RVA é fundamental para se avaliar o impacto e o sucesso da vacinação (Kang, 2006; Cortese et al., 2009).

Em bovinos, a vacinação do rebanho permite a transferência dos anticorpos passivamente para a prole através da ingestão do colostro, garantindo assim, um nível eficiente de imunidade intestinal (Agrawal et al., 2002; Steele et al., 2004; Dhama et al., 2009). A transferência de anticorpos contra RVA através do colostro é uma ferramenta crucial na proteção dos bezerros neonatos (Saif e Fernandez, 1996; Dodet et al., 1997). O reforço nos anticorpos maternos é conseguido através da imunização do rebanho poucas semanas antes do nascimento (Saif e Fernandez, 1996; Steele et al., 2004; Dhama et al., 2009). Essa vacinação é realizada de forma combinada utilizando tanto a via intramuscular quanto a via intrauterina, aumentando significativamente o título de anticorpos séricos e aqueles presentes no colostro (Saif e Fernandez, 1996).

Vacinas inativadas disponíveis comercialmente são bastante eficientes na prevenção e controle da diarreia por RVA em equinos, reduzindo consideravelmente a infecção de potros (Fukai et al., 2006; Dhama et al., 2009). Em suínos e ovinos, assim como os bovinos, a vacinação profilática da vara ou rebanho semanas antes do parto e a consequente transferência de imunidade através da ingestão de colostro também é muito utilizada (Holland, 1990; Dhama et al., 2009). Não existem vacinas disponíveis para prevenir RVA em cães e gatos (Dhama et al., 2009).

A alta incidência de diarreia causada por RVA em bovinos e outros animais domésticos tem impulsionado a comunidade científica a concentrar seus esforços no desenvolvimento de novas gerações de vacinas (Dhama et al., 2009). Como consequência, vacinas utilizando tecnologia de DNA recombinante, partículas semelhantes a vírus (*virus-like particles* – VLP) e a base de plantas comestíveis (*plant-based edible vaccines*) estão sendo projetadas (Dhama et al., 2008; Dhama et al., 2009).

1.8.8 Transmissão do rotavírus do grupo A

Infecções por RVA são adquiridas principalmente por via fecal-oral, incluindo

fômites e contato pessoa a pessoa ou com objetos contaminados (Timenetsky et al., 2004; Leung et al., 2005; Cortese et al., 2009; Koroglu et al., 2011; Brassard et al., 2012). A transmissão de RVA através do consumo de água ou alimentos contaminados é documentada, entretanto parece ser rara (Timenetsky et al., 2004; Cortese et al., 2009). Embora os RVA tenham sido detectados em amostras de urina e no trato respiratório superior, acredita-se que estes fluídos corporais não estão comumente associados a sua transmissão (Vollet et al., 1981; Zheng et al., 1991; Anderson e Weber, 2004).

Pequenas porções de vírus infectantes são capazes de infectar e causar doença em hospedeiros susceptíveis (Bishop, 1996). RVA se dissemina facilmente entre familiares, sendo que 30-50% dos adultos que entram em contato com crianças infectadas desenvolvem a doença. Vale ressaltar, que a infecção por RVA em adultos é geralmente assintomática ou subclínica devido à existência de anticorpos neutralizantes produzidos por exposição prévia (Cortese et al., 2009).

RVA podem ser transmitidos para bovinos neonatos através de leite, água e alimentos contaminados (Steele et al., 2004; Malik et al., 2005; Dhama et al., 2009). Os animais infectados excretam altas concentrações de vírus nas fezes, sendo assim a contaminação do ambiente pode causar uma infecção generalizada no rebanho (Chauhan e Singh, 1996; Dhama et al., 2009). Ainda, a aglomeração de bovinos pode acelerar a velocidade de transmissão através do contato direto entre os animais (Chauhan e Singh, 1996). Bois ou búfalos infectados nos estágios tardios de gestação podem excretar vírus nas fezes e contaminar sua própria prole (Dhama et al., 2009).

1.8.8.1 Transmissão interespecie e potencial zoonótico do rotavírus do grupo A

A habilidade de transmissão do RVA entre espécies de mamíferos é demonstrada há muito tempo, principalmente através da análise de anticorpos e estudos de desafio (Castrucci et al., 1985; Dhama et al., 2009). Na década de 70, experimentos conduzidos com bezerros inoculados com RVA humano ou equino demonstraram que os mesmos exibem proteção quando são desafiados com cepas bovinas, evidenciando a relação de proximidade (Woode et al., 1978; Dhama et al.,

2009). A capacidade de RVA humano em infectar bezerros e leitões também foi relatada e notou-se que os leitões eram capazes de excretar o vírus sem apresentar sintomas clínicos, enquanto os bezerros desenvolviam lesões intestinais (Mebus et al., 1977; Dhama et al., 2009).

Os estudos também sugerem que os RVA suínos, murinos, símios e equinos estão antigeneticamente relacionados (Castrucci et al., 1985; Dhama et al., 2009). Anticorpos contra RVA humano foram detectados em leite de vaca (Yolken et al., 1985; Dhama et al., 2009). Em um estudo conduzido por Castrucci et al. (1984), bezerros se mostraram susceptíveis a RVA de coelhos e estes, também se infectaram com RVA bovino. Esse mesmo grupo de investigadores também demonstrou que bezerros podem se infectar com RVA de origem símia, porcina ou leporídea (Castrucci et al., 1985). De modo semelhante, cães e gatos também podem excretar RVA de origem bovina (Schwers et al., 1982) e a transmissão de RVA de mamíferos para aves também já foi documentado (Wani et al., 2003).

Mais recentemente, os adventos da biologia molecular e do sequenciamento genético permitiram a identificação em humanos de genótipos G e P de RVA animais em diferentes partes do mundo (Santos e Hoshino, 2005; Gentsch et al., 2005). O sequenciamento do genoma completo de cepas de RVA humanas pertencentes ao genótipo G3P[3] (Ro1845 e HCR 3A) revelou que ambas as cepas estão intimamente relacionadas tanto com RVA de linhagens caninas (CU-1; K9 e A79-10) quanto felinas (Cat97) (Tsugawa e Hoshino, 2008). RVA de equinos parecem exibir uma relação genética íntima com RVA derivados de humanos e suínos. A comparação de sequências de nucleotídeos da proteína NSP4 de cepas detectadas em equinos e suínos representam um excelente exemplo de transmissão interespecie entre porcos e cavalos (Ciarlet et al., 2001).

Cepas de RVA G3 (comum em gatos, cães, porcos e cavalos); G5 (comum em porcos e cavalos); G6, G8 e G10 (comum em gado) e G9 (comum em porcos e cordeiros) foram identificados em populações humanas em diferentes partes do mundo (Timenetsky et al., 1997; Desselberger et al., 2001; Malik et al., 2005; Ramani e Kang, 2007). Genótipos G4, G5, G6 e G8 de origem porcina foram encontrados circulando em humanos, bezerros e camelos (Dhama et al., 2009). Esses dados sugerem que os

suínos talvez configurem como o principal reservatório de RVA e a principal fonte geradora de cepas emergentes, tanto em humanos quanto em outros animais (Parra et al., 2008; Dhama et al., 2009). Na Hungria, cepas atípicas P[6] e P[9], com suposta origem animal, foram detectadas em humanos (Bányai et al., 2003; Bányai et al., 2004), evidenciando mais uma vez, que os animais apresentam potencial para atuar como fonte viral e/ou de material genético. Frente a essas considerações, os RVA devem ser considerados como potenciais patógenos zoonóticos (Martella et al., 2010). De um modo geral, a análise da sequência dos genes que codificam as duas proteínas neutralizantes que formam o capsídeo externo dos RVA (VP7 e VP4) parece ser uma ferramenta muito útil na coleta de dados epidemiológicos e no rastreamento da origem de cepas incomuns de RVA.

O principal meio de transmissão zoonótica é o contato íntimo entre humanos e animais. O risco de transmissão zoonótica também está presente na contaminação de reservatórios de água ou alimentos por excrementos de animais infectados (Malik et al., 2005; Dhama et al., 2009). Entretanto, existe uma limitação muito importante no estudo das zoonoses causadas por RVA: a falta de vínculo epidemiológico entre casos humanos e animais. Dessa forma, o estudo do evento zoonótico de uma cepa particular de RVA é constatado apenas com evidências filogenéticas e dados disponíveis sobre a frequência de detecção de um genótipo específico em um hospedeiro particular (Bányai et al., 2010). Vigilâncias epidemiológicas que contemplem animais domésticos, animais de estimação e humanos são fundamentais para avaliar o potencial zoonótico das cepas de RVA, principalmente em áreas rurais (Badaracco et al., 2012).

1.8.9 Diversidade genética e evolução dos rotavírus do grupo A

Os RVA se diversificam e evoluem através de dois mecanismos principais (Kang et al., 2007). O primeiro mecanismo é a acumulação de mutações pontuais, as quais dão origem às linhagens genéticas e levam ao surgimento de mutantes capazes de escapar de anticorpos previamente existentes. O segundo mecanismo é o *shift* gênico, ocorrendo troca de material genético através de rearranjos (*reassortants*) dos

segmentos genéticos durante a infecção de uma única célula por dois ou mais tipos diferentes de RVA (Estes, 2001; Iturriza-Gomara et al., 2001).

Uma consideração importante é o fato de que rearranjos entre RVA de origem animal e humano também podem ocorrer, gerando vírus quiméricos contendo segmentos genômicos de ambos. Acredita-se que quando o RVA atravessa a barreira interespecie, o mesmo não é capaz de infectar e de se disseminar de forma eficiente no novo hospedeiro. Entretanto, ao adquirir segmentos humanos, tais vírus quiméricos aumentariam suas chances de se difundir de forma eficiente entre a população humana (Martella et al., 2010). Dessa forma, a transmissão zoonótica e o rearranjo de segmentos genéticos entre RVA de origem humana e animal contribuem efetivamente para o aumento da diversidade de cepas que infectam humanos (Vesikari et al., 1984).

Na América Latina, o genótipo G5 foi primeiramente detectado no Brasil no início da década de 80 em amostras de crianças e, subsequentemente, identificado na Argentina e Paraguai (Gouvea et al., 1994a; Timenetsky et al., 1997; Coluchi-Mareco, 2001; Mascarenhas et al., 2002). A análise de hibridização RNA-RNA e o sequenciamento genético dessas cepas demonstraram que houve um rearranjo natural entre RVA humano (linhagem Wa) e suíno (Alfieri et al., 1996). Esses estudos utilizando tecnologias de hibridização e análises de sequenciamento trazem amplas evidências de transmissão interespecie durante o processo de evolução dos RVA (Palombo, 2002).

Um fator crucial para a geração de RVA rearranjados é a alta frequência de co-infecção. Nos países em desenvolvimento a taxa de co-infecção é maior (cerca de 20%) que nos países desenvolvidos (cerca de 5%) (WHO 2011). Isso também pode explicar porque a frequência de detecção de cepas atípicas é maior nos países em desenvolvimento (Patton, 2012).

Indícios de que tipos G e/ou P incomuns podem se tornar epidemiologicamente importantes vem se acumulando ao redor do mundo (Gentsch et al., 2005; Santos e Hoshino, 2005). Entretanto, é difícil prever quais cepas ou se de fato alguma cepa conseguirá se disseminar a fim de tornar-se globalmente comum. A cepa G9P[8] representa um exemplo recente de que essa disseminação é possível, uma vez que foi previamente considerada rara e, atualmente, assume uma posição dominante entre as

cepas circulantes no mundo (Patton, 2012). Mais recentemente, relatos provenientes de países desenvolvidos e em desenvolvimento evidenciam um aumento na frequência de detecção do genótipo G12, indicando que esta será, provavelmente, a próxima cepa a se tornar globalmente dominante (Rahman et al., 2007; Patton, 2012). Essas duas cepas em particular, G9 e G12, provavelmente tiveram origem suína e passaram a infectar humanos a partir de rearranjos gênicos (Martella et al., 2010).

Estudos sobre as constelações genômicas que constituem os RVA foram iniciados em 2008 e revelaram uma relação evolucionária muito próxima entre a cepa humana *Wa-like* e cepas porcinas e, entre a cepa humana *DS-1-like* e cepas bovinas, sugerindo que estes dois principais genogrupos humanos talvez tenham origem zoonótica (Matthijnssens et al., 2008a; Martella et al., 2010). A análise das constelações genômicas também suporta a hipótese de que os RVA humanos mantêm combinações preferenciais durante sua evolução (Matthijnssens et al., 2008a; Matthijnssens et al., 2008b). Embora a diversidade genotípica dos RVA possa ser muito grande (mais 40 combinações G/P já foram descritas), algumas preferências parecem ser mantidas na natureza (Santos e Hoshino, 2005; Greenberg e Estes, 2009).

Pressões seletivas favorecem a manutenção de grupos de proteínas que atuam de forma ideal na replicação viral. Por exemplo, a compatibilidade proteína-proteína pode explicar porque a combinação G1P[8] e G2P[4] é tão frequente (Matthijnssens et al., 2008a; Matthijnssens et al., 2008b; Matthijnssens et al., 2012; Patton, 2012). Ainda, as duas grandes constelações de genótipos, *Wa-like* e *DS-1-like*, circulam entre os humanos de todo o mundo. A constelação de genótipos *Wa-like* composta por I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1 apresenta-se em combinação com P[8] e diferentes genótipos G, entre eles, G1, G3, G4, G9 e G12; enquanto a constelação *DS-1-like* composta por I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2 apresenta-se em combinação com P[4] e G2 ou G8. O aumento exponencial no número de genomas completos de RVA sequenciados nos últimos anos permitiu uma visão mais completa da evolução desses vírus. Esses dados moleculares indicam que a diversidade genética dos 9 genes, excluindo os segmentos G e P, é extremamente limitada e restrita a essas duas constelações (Matthijnssens e Van Ranst, 2012).

Portanto, apesar dos RVA terem a capacidade de trocar genes pelo mecanismo do rearranjo genético, o custo dessa troca parece não garantir vantagens evolucionárias no sucesso de sua expansão entre as cepas virais circulantes (Matthijssens et al., 2008a; Matthijssens et al., 2008b; Matthijssens et al., 2012; Patton, 2012). Cepas de RVA que possuem a constelação genotípica animal não conseguem ser transmitidos de forma eficiente entre humanos, provavelmente devido à falta da constelação genotípica adaptada para infectar e transmitir de forma eficiente entre os humanos (Matthijssens e Van Ranst, 2012).

Análises gênicas também demonstraram que cepas que compartilham o mesmo genótipo (e.g. G3P[8]) podem apresentar diferenças alélicas, incluindo cepas coletadas dentro de uma mesma estação epidêmica. Esses dados indicam que distintas classes de vírus com o mesmo genótipo podem co-circular numa única temporada (Patton, 2012).

A vigilância dos tipos circulantes de G e P nas populações humanas e animais são considerados essenciais para a compreensão da evolução dos RVA e, ultimamente, para a avaliação da eficácia das vacinas comercializadas (Parra, 2009). A diversidade genética, a capacidade dos RVA humanos evoluírem rapidamente e de realizarem rearranjos sugere que as vacinas contra RVA devam ser capazes de prover uma boa proteção heterotípica, a fim de serem efetivas nas diferentes regiões do globo (Kang et al., 2007). De fato, essa característica peculiar dos RVA em realizar rearranjos também é utilizada no desenvolvimento das vacinas (Parashar et al., 1998).

É importante considerar que a introdução de vacinas contra o RVA pode alterar a seleção natural que atua sobre o vírus, impondo forças evolucionárias que podem acarretar em uma mudança no cenário epidemiológico mundial (Gentsch et al., 2005; Santos e Hoshino, 2005). A pressão seletiva vacinal pode levar muitos anos até conseguir se tornar aparente, entretanto um estudo recente na Nicarágua, país que vacina exclusivamente com RotaTeq[®], demonstrou que o RVA G1P[8] detectado nas fezes de duas crianças com gastroenterite e previamente vacinadas, exibia NSP2 com sequência nucleotídica idêntica ao vírus vacinal (Bucardo et al., 2012; Patton, 2012). Esses dados sugerem que segmentos genômicos provenientes de vacinas poderão ser introduzidos no *pool* de RVA humanos circulantes através de rearranjos (Patton, 2012).

Ainda, a pressão seletiva conferida pela vacinação pode ocasionar, em longo prazo, uma redução da eficácia vacinal (Grant et al., 2011).

1.9 Rotavírus do grupo C

O RVC causa diarreia aguda em humanos e animais (Saif e Jiang, 1994; Estes e Kapikian, 2007). RVC foi primeiramente identificado em suínos em 1980 (Saif et al., 1980; Bohl et al., 1982) e originalmente descrito na literatura como “pararotavírus” devido o seu padrão de migração atípico em EGPA (Bridger et al., 1986). Em 1982, Rodger et al. (1982) reportaram a detecção de um agente semelhante ao rotavírus (*rotavirus-like agent*) em fezes de uma criança com diarreia aguda. Em 1986, Bridger et al. (1986) caracterizaram o RVC definitivamente como um patógeno humano. Além de humanos e suínos, o RVC também foi detectado em outros mamíferos, tais como, furões (*ferrets*) (Torres-Medina, 1987; Wise et al., 2009), cães (Otto et al., 1999) e bovinos (Tsunemitsu et al., 1991; Chang et al., 1999; Mawatari et al., 2004).

1.9.1 Classificação dos rotavírus do grupo C

O RVC não se replica facilmente em cultura celular e isso dificulta o desenvolvimento e a utilização de ensaios de neutralização para sorotipá-lo (Oseto et al., 1994). Os antissoros monoclonais específicos, existentes para RVA, não estão disponíveis para RVC (Schnagl et al., 2004). Dessa forma, o estudo das relações de parentesco dos RVC só pode ser inferido a partir da análise das sequências de seus genes.

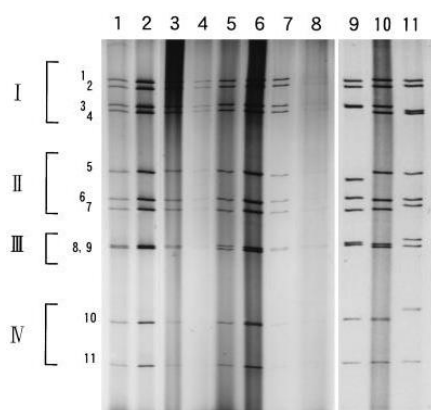
1.9.1.1 Subgrupos de rotavírus grupo C

Três genogrupos diferentes de RVC foram propostos baseando-se na diversidade genética da VP6 (codificada pelo segmento 5); sendo um genogrupo humano, um bovino e um suíno (Jiang et al., 1999; Rahman et al., 2005a; Abid et al., 2007; Médici et al., 2010). Estudos genéticos recentes utilizando cepas bovinas e

suínas demonstraram que parece haver uma maior variabilidade genética na sequência do gene que codifica para a proteína VP6 do que se pensava anteriormente (Martella et al., 2007b; Jeong et al., 2009; Médici et al., 2010; Park et al., 2011), sugerindo a existência de mais de um genogrupo por espécie (Médici et al., 2010).

1.9.1.2 Perfil eletroforético dos rotavírus do grupo C

Existe uma tentativa de classificação dos RVC quanto ao seu padrão eletroforético em EGPA, baseada na velocidade de migração dos segmentos de cepas japonesas. Os RVC foram classificados em 3 padrões distintos denominados I (cepa OK118 – ET I), II (cepa OK450 – ET II) e III (cepa K9304 – ET III) (Kuzuya et al., 1996; Kuzuya et al., 1998) (Figura 12). Esses isolados foram propagados de forma eficiente em cultura de células CaCo-2 e podem ser úteis na elaboração de uma classificação mais precisa dos tipos eletroforéticos de RVC (Kuzuya et al., 2007).



Fonte: Kuzuya et al., 1998 modificado pelo autor

Figura 12. Comparação de perfis eletroforéticos de RVC em EGPA. Linha 6: cepa K9304 que exhibe padrão III; Linha 9: cepa OK118 que exhibe padrão I; Linha 11: cepa OK450 que exhibe padrão II. Linhas 1-5, 7, 8 e 10 representam os perfis eletroforéticos de outros RVC isolados no período entre novembro/1992 e abril/1993 a partir de pacientes com gastroenterite aguda proveniente de hospitais localizados em 10 prefeituras diferentes no Japão. Os números romanos à esquerda indicam os segmentos de RNA_{df} referentes às quatro regiões variáveis do genoma e suas respectivas classes.

1.9.1.3 Sistema Binário de Classificação dos Rotavírus do grupo C

A comparação das sequências sugere que exista uma diversidade genética entre cepas de RVC, da mesma forma que é encontrada em RVA. Dessa forma, um sistema de classificação gênica baseada em VP7 (G) e VP4 (P) também foi estabelecido para RVC (Fielding et al., 1994; Tsunemitsu et al., 1996; Rahman et al., 2005a). Entretanto, essa classificação ainda não foi formalmente reconhecida (Médici et al., 2010).

Como citado anteriormente, a variabilidade genética da proteína VP7 também está presente nos RVC (codificada pelo segmento 8), assim como é observada no RVA. Entretanto, essa variação fica evidente apenas quando cepas de RVC de origem humana e animal são comparadas entre si e não é observada entre as cepas de origem humana (Schnagl et al., 2004; Kuzuya et al., 2007). Todas as cepas de RVC humanas analisadas até o momento apresentaram alto grau de conservação em suas sequências de VP7, não permitindo a diferenciação de genótipos G e sugerindo que os RVC humanos detectados em todo o mundo pertençam a um único genótipo (G4) (Nilsson et al., 2000b; Schnagl et al., 2004; Khamrin et al., 2008). Até o momento, 9 genótipos G (G1-9) foram sugeridos para RVC comparando cepas humanas e animais utilizando sequenciamento genético e análises antigênicas da proteína VP7 (Martella et al., 2007b; Marthaler et al. 2013).

Um alto grau de conservação também é observado no gene que codifica para a proteína VP4 no RVC humanos (codificada pelo segmento 3). Entretanto, novamente, uma grande diferença é evidenciada entre cepas de origem humana e cepas bovinas e suínas, permitindo a identificação de 3 genótipos P distintos (Fielding et al., 1994; Schnagl et al., 2004; Kuzuya et al., 2007; Khamrin et al., 2008).

1.9.1.4 Sistema de classificação do genoma completo de rotavirus do grupo C: constelação de genótipos

O sistema de classificação de RV está limitado às cepas RVA, mas o RCWG pretende desenvolver sistemas semelhantes para as cepas pertencentes aos demais grupos de RV. Entretanto, isso só será possível quando um número maior de sequências genômicas completas estiverem disponíveis. Em relação às cepas de RVC,

o sequenciamento do genoma completo foi realizado em apenas 8 cepas: para a cepa suína Cowden e para outras 7 cepas humanas detectadas no Reino Unido, Japão, China, Bangladesh e Índia (Bremont et al., 1992; Chen et al., 2002; Yamamoto et al., 2011). No futuro, a análise genética dessas e de outras cepas de RVC permitirão calcular os limites que irão definir os novos genótipos (Matthijnssens et al., 2011).

1.9.2 Imunidade contra rotavírus do grupo C

Nenhum estudo visando compreender a resposta imune específica resultante da infecção por RVC foi realizado até o momento, seja em hospedeiros humanos ou animais; entretanto devem seguir o mesmo padrão de proteção humoral e celular exibido pelo RVA (Bishop et al., 1983; Offit et al., 1986;). Sabe-se que a infecção natural por RVA confere proteção clínica significativa durante uma re-infecção (Linhares e Bresee, 2000) e esse mesmo tipo de proteção também deve ser desencadeado pelo RVC. Sugere-se que a infecção natural por RVA também possa conferir proteção cruzada contra RVC, uma vez que, estes últimos parecem causar um quadro sintomático mais leve quando comparados ao causado por RVA (Jiang et al., 1995; James et al., 1997; Sanchez-Fauquier et al., 2003). Estudos soroepidemiológicos indicam uma maior prevalência de RVC, tanto nas populações humanas quanto animais, do que a prevalência evidenciada pela detecção direta de RVC em amostras fecais (Riepenhoff-Talty et al., 1997; Castello et al., 2000; Nilsson et al., 2000a). Especula-se que essa diferença nas prevalências também possa ser resultante de uma possível proteção cruzada entre RVA e RVC.

Nos RVA, as proteínas do capsídeo externo, VP7 (tipo-G) e VP4 (tipo-P), estimulam a produção de anticorpos séricos neutralizantes, conferindo proteção homotípica aos hospedeiros (Offit et al., 1986; Hoshino et al., 1988; Ward, 1996). A mesma variabilidade genética está presente nos RVC de origem porcina (Martella et al., 2007b) e, portanto, esse tipo de proteção sorotipo-específico também deve ocorrer nesses hospedeiros. Por outro lado, todas as cepas humanas de RVC analisadas até o momento pertencem a um único genótipo G (G4), dificultando tal especulação.

1.9.3 Diagnóstico dos rotavírus do grupo C

O diagnóstico dos RVC é difícil, pois os EIAs disponíveis comercialmente não reconhecem seu antígeno de grupo específico (VP6) (Jiang et al., 1995; Kuzuya et al., 1996). A detecção de RVC pode ser realizada através da identificação do padrão de migração eletroforético característico de seus segmentos de RNA_{df} em EGPA (Jiang et al., 1995; Gabbay et al., 2008). EGPA é um método de diagnóstico importante para a detecção de RVC, entretanto é pouco sensível, uma vez que requer genoma íntegro e a presença de pelo menos 10^8 a 10^{10} partículas virais para a obtenção de um resultado positivo (Jiang et al., 1995; Kuzuya et al., 1996; Gabbay et al., 2008).

RVC pode ser detectado por microscopia eletrônica (Bridger et al., 1986), mas o fato de RVC compartilhar a mesma homologia com os RVA, desqualifica a microscopia eletrônica como ferramenta diagnóstica discriminatória (Nilsson et al., 2000a). Métodos de identificação sorológica de RVC através de imunomicroscopia eletrônica utilizando antissoros hiperimunes também foram desenvolvidos, visando auxiliar o diagnóstico desse agente viral. No entanto, não existe variabilidade disponível de antissoros de referência suficiente para monitorar todos os casos (Fujii et al., 1992). Fujii et al. (1992) desenvolveu um método de EIA do tipo sanduíche utilizando MAbs para a detecção específica de RVC em suspensão fecal.

Existe um teste de hemaglutinação passiva reversa (*reverse passive hemagglutination teste* – RPHA) desenvolvido e comercializado no Japão pela Denka Seiken Co. Ltd. Nesse teste, hemácias sensibilizadas com anticorpos anti-RVC purificados são fixadas em microplacas. Inóculos (sobrenadantes) preparados com fezes dos pacientes são incubados por 2 horas nas microplacas, permitindo que o antígeno de RVC presente nas fezes promova a hemaglutinação. O RPHA é um teste rápido e simples usado rotineiramente para o diagnóstico de RVC nos hospitais e clínicas japonesas, facilitando a triagem de amostras (Phan et al., 2004). Contudo, segundo Phan et al. (2004), EGPA e a RT-PCR são metodologias mais sensíveis que o RPHA.

A RT-PCR utilizando primers específicos para a detecção dos RVC é a opção mais sensível (Gouvea et al., 1991), contudo não pode ser amplamente empregada

devido ao seu alto custo e à dificuldade de ser utilizada como ferramenta diagnóstica na investigação de grandes coleções fecais (Gabbay et al., 2008). Atualmente, a ibridização de DNA e o sequenciamento gênico utilizando probes e primers específicos para RVC são as metodologias utilizadas na confirmação de amostras positivas para RVC (Gabbay et al., 2008).

Recentemente, Clark et al. (2009) demonstraram a possibilidade de expressar com sucesso as proteínas virais VP4, VP6 e VP7 de RVC em células de inseto e desenvolveram um soro hiperimune específico capaz de reagir tanto com RVA quanto RVC, o que pode proporcionar o desenvolvimento de novas ferramentas diagnósticas. Dados sobre as sequências gênicas de RVC provenientes de diferentes partes do mundo também poderão contribuir para o desenvolvimento de ferramentas diagnósticas mais sensíveis e específicas a serem utilizadas na investigação da distribuição global do vírus (Jeong et al., 2009).

1.9.4 Epidemiologia dos rotavírus do grupo C

Em humanos, as infecções por RVC foram descritas associadas tanto a episódios esporádicos quanto a grandes surtos de gastroenterite, acometendo todas as faixas etárias e em diferentes regiões do mundo (Gabbay et al., 1989; Matsumoto et al., 1989; Caul et al., 1990; Timenetsky et al., 1993; Jiang et al., 1996; Souza et al., 1998; Gabbay et al., 1999; Rahman et al., 2005a; Abid et al., 2007). Os surtos de gastroenterite por RVC parecem acometer principalmente adultos, crianças mais velhas e surtos intrafamiliares (Maunula et al., 1992; Souza et al., 1998; Phan et al., 2004). Curiosamente, RVC também já foi associado a um caso de atresia biliar extra-hepática em criança (Riepenhoff-Talty et al., 1996). O RVC apresenta-se globalmente distribuído e é considerado como um patógeno emergente (Kuzuya et al., 2007).

Há poucos trabalhos considerando as características epidemiológicas das infecções por RVC em humanos, principalmente devido ao fato de não haverem reagentes comerciais disponíveis para seu diagnóstico (Kuzuya et al., 2007). Por essa razão, o papel desse vírus na etiologia das diarreias humanas ainda não é bem compreendido (Médici et al., 2009). Muitas questões ainda são levantadas sobre a

patogênese do RVC, uma vez que estes agentes são frequentemente encontrados em co-infecções com outros patógenos entéricos, especialmente bactérias, como *Vibrio cholerae* e *Shigella flexneri* (Rahman et al., 2005a). Entretanto, a co-infecção de RVC com outros patógenos virais (e.g. RVA e Norovírus) parece ser mais rara (Phan et al., 2004).

Estudos epidemiológicos retrospectivos conduzidos em populações de diversos países indicam que a idade de maior risco para infecção por RVC são indivíduos >4 anos, em contraste com os RVA, o qual exibe maior prevalência em <3 anos (Oishi et al., 1993). Considerando o fato de que as infecções por RVC são menos agressivas e atingem populações mais velhas, esse patógeno poderia permanecer não detectado, uma vez que os adultos raramente buscam tratamento para doenças entéricas leves. Dessa forma, a incidência de RVC pode ser maior do que é descrita atualmente (Bridger et al., 1986; Tsunemitsu et al., 1992a; Steyer et al., 2006). Essa suposição também é confirmada por estudos soropidemiológicos, os quais revelaram na população humana uma prevalência de RVC variando de moderada a alta (30-66%) em diferentes regiões geográficas (Riepenhoff-Talty et al., 1997; Castello et al., 2000; Nilsson et al., 2000a). O padrão de sazonalidade dos RVC é desconhecido ou inexistente e, aparentemente, podem ser detectados durante todo o ano (Sánchez-Fauquier et al., 2003; Castello et al., 2009a).

Um estudo recente conduzido por Meleg et al. (2008) na Hungria investigou a ecologia do RVC do ponto de vista da virologia ambiental, utilizando a tecnologia da PCR em tempo real (RT-qPCR). RVC foi detectado em amostras de esgoto bruto, sugerindo que o vírus permanece em circulação. Entretanto não foi observado aumento significativo no número de surtos ou casos esporádicos por RVC na mesma região investigada (Meleg et al., 2008).

No Brasil a infecção por RVC foi identificada primeiramente por Pereira et al. (1983). Desde então, infecções causadas por RVC foram identificadas esporadicamente ou em surtos em vários momentos e localidades (Gabbay et al., 1989; Timenetsky et al., 1993; Souza et al., 1998; Teixeira et al., 1998; Gabbay et al., 1999). Um estudo soropidemiológico conduzido por Cox et al. (1998) no Brasil em 1990 revelou a presença de 36% de anticorpos contra RVC na população adulta,

resultado similar aos encontrados em outros países (Riepenhoff-Talty et al., 1997; Nilsson et al., 2000a; Castello et al., 2002), sugerindo a mesma discrepância observada mundialmente entre a maior prevalência sorológica de RVC quando comparada com a baixa detecção direta de RVC nas fezes.

O papel e a distribuição global dos RVC em animais permanecem obscuros, principalmente devido ao limitado número de estudos realizados. Estudos sorológicos demonstraram que o RVC é prevalente na população adulta bovina nos Estados Unidos, Reino Unido e Japão, variando de 24 a 56% (Bridger, 1987; Tsunemitsu et al., 1992b). Entretanto, de modo semelhante ao que ocorre com a população humana, a taxa de detecção de RVC em amostras fecais de bovinos, apresentando sintomas ou não, é muito baixa (Chang et al., 1999). Experimentalmente, a co-infecção de bovinos com RVA contribui para o aumento da excreção de RVC e a extensão das lesões histológicas no intestino delgado (Chang et al., 1999). Esse dado sugere que o curso clínico da infecção por RVC em gado poder ser alterado pela co-infecção com outros patógenos (Park et al., 2010). Outros estudos sugerem que a diarreia causada por RVC se dissemina rapidamente entre bovinos, sendo caracterizada por alta morbidade e baixa mortalidade e, ainda, que a lactação talvez esteja associada à susceptibilidade de infecção por RVC ou a manifestação da diarreia (Tsunemitsu et al., 1991; Mawatari et al., 2004).

Surtos de diarreia associada a RVC são melhores documentados em suínos (Morin et al., 1990; Kim et al., 1999), inclusive no Brasil (Sigolo de San Juan et al., 1986; Alfieri et al., 1999), atingindo leitões durante a amamentação, desmame e pós-desmame (Morin et al., 1990; Saif e Jiang, 1994; Martella et al., 2007a). Estudos soropidemiológicos limitados sugerem que a infecção por RVC ocorre de forma generalizada e, presumivelmente, enzoótica em fazendas de porcos (Tsunemitsu et al., 1992b; Saif e Jiang, 1994) e reportam uma prevalência de anticorpos contra RVC variando de 28-70% em leitões de 8 semanas de idade. A prevalência de anticorpos aumenta com a idade e atinge 79-100% em porcos adultos (Terrett et al., 1987; Saif e Jiang, 1994; Martella et al., 2007a). A detecção de RVC em leitões assintomáticos também já foi relatada (Collins et al., 2008), entretanto estudos futuros são necessários

a fim de elucidar precisamente o papel dos RVC em tais circunstâncias (Jeong et al., 2009).

Em suínos, assim como em humanos, RVC também é detectado em infecções associadas a outros enteropatógenos (e.g. *E. coli*, *Salmonella* spp), inclusive virais (.i.g. RVA) (Martella et al., 2007a; Jeong et al., 2009). Não existem relatos consistentes a cerca da sazonalidade das infecções por RVC em suínos. Na Coréia do Sul, Jeong et al. (2009) e Lee et al. (2011) relatam maior frequência de detecção de RVC em porcos durante a primavera e verão.

1.9.5 Distribuição das cepas de rotavírus do grupo C

É comum utilizar as combinações dos genótipos G e P dos RVA nas investigações epidemiológicas (Ramachandran et al., 2000; Kapikian et al., 2001). Contudo, a menor variabilidade sorotípica dos RVC limita tal aplicação.

O RVC porcino exhibe a maior diversidade, classificados em G1 (representado pela cepa suína Cowden), G3 (representado pela cepa suína HF), G5 (representado pela cepa suína 134/04-18), G6 (representado pela cepa suína 134/04-2), G7 (representado pela cepa suína 42-05-21), G8 (representado pela cepa suína 1GA/05/Cork) e G9 (representado pela cepa suína TN10-51). O RVC bovino é classificado como G2 (representado pela cepa bovina Shintoku) e as cepas humanas são classificadas como G4 (Tsunemitsu et al., 1996; Jiang et al., 1999; Adah et al., 2002; Rahman et al., 2005a; Martella et al., 2007b; Collins et al., 2008, Marthaler et al., 2013). Análise genética da proteína VP4 realizada por Jiang et al. (1999) propôs três genótipos P distintos para os RVC: P[1] porcino (C/PO/Cowden); P[2] humano (C/HU/Belém) e P[3] bovino (C/BO/Shintoku).

Sabe-se que diferentes cepas de RVA são repetidamente introduzidas ou reintroduzidas nas populações susceptíveis (humana e animal) ao longo dos anos e/ou estações. Essas reintroduções refletem o mecanismo clássico de pressão seletiva devido ao aumento de imunidade da população susceptível às cepas de RVA circulantes (Arista et al., 2006). É possível que um mecanismo similar também direcione a evolução dos RVC, principalmente em hospedeiros suínos (apresentam

maior variabilidade de genótipos G), permitindo que flutuações temporais de cepas distintas ocorram (Martella et al., 2007b).

1.9.6 Manifestações clínicas dos rotavírus do grupo C

De acordo com algumas observações, os RVC causam um quadro sintomático relativamente mais leve que os RVA, marcado por episódios de febre e vômito breves, menor desidratação e poucas hospitalizações (Jiang et al., 1995; Sanchez-Fauquier et al., 2003). Uma possível explicação seria a existência de proteção cruzada entre os RVA e RVC. A população nos primeiros meses de vida apresenta baixa imunidade e alta susceptibilidade à infecção primária por RVA, a qual geralmente se manifesta de forma aguda. Por essa razão, a infecção subsequente por RVC poderia resultar em um quadro sintomático mais brando (James et al., 1997).

Os suínos apresentam diarreia abundante e vômito ocasional (Morin et al., 1990; Kim et al., 1999). Poucas informações clínicas sobre a infecção de gado por RVC estão disponíveis na literatura. RVC foi identificado durante um surto de diarreia entre vacas leiteiras adultas no Japão em 2002. Nesse episódio em particular, o gado apresentou fezes líquidas e com coloração acastanhada, mas sem a presença de sangue. Todas as vacas infectadas se recuperaram em 3-5 dias, entretanto foi observada uma diminuição significativa na produção de leite logo após o início dos sintomas, se prolongado por até uma semana (Mawatari et al., 2004). Ainda no Japão, uma diminuição na produção de leite entre gado infectado com RVC já havia sido observada uma década antes (Tsunemitsu et al., 1991).

Um caso raro de gastroenterite em furões foi descrito por Wise et al. (2009), onde animais eutanasiados após histórico de diarreia foram estudados. O exame macroscópico revelou achados compatíveis com desidratação, como abdômen distendido, provavelmente pela ação de gases e fluidos e paredes finas no intestino delgado. Microscopicamente o intestino delgado exibia atrofia entérica superficial aguda com degeneração, necrose e descamação das vilosidades. Esses achados histológicos eram compatíveis com gastroenterite causada por RV e o RT-PCR revelou a detecção de RVC (Wise et al., 2009).

1.9.7 Prevenção contra infecção por rotavírus do grupo C

Os RVC demonstram a mesma resistência aos métodos comuns de desinfecção que aquelas exibidas pelos RVA (Dhama et al., 2009). Entretanto, supõe-se que o RVC não seja tão estável quanto o RVA e que seja excretado em concentrações menores nas fezes de hospedeiros infectados (Jiang et al., 1995; Chang et al., 1999). Boas práticas de higiene podem auxiliar na redução das taxas de infecção por RVC. A caracterização epidemiológica dos RVC é muito limitada, o que dificulta a implementação de medidas de controle mais específicas (Médici et al., 2010), tanto em humanos quanto em animais. Um maior número de estudos moleculares é necessário para o desenvolvimento de medidas profiláticas baseada em vacinação (Médici et al., 2010).

1.9.8 Transmissão do rotavírus do grupo C

A transmissão de RVC, provavelmente, segue a mesma rota das infecções por RVA: fecal-oral, vômitos, contato pessoa a pessoa ou com objetos contaminados e consumo de água ou alimentos contaminados (Timenetsky et al., 2004; Leung et al., 2005; Cortese et al., 2009; Koroglu et al., 2011; Brassard et al. 2012). Considerando a via de transmissão ambiental, Meleg et al. (2008) detectou RVC em amostras de esgoto, mas não evidenciou a transmissão viral para hospedeiros susceptíveis.

1.9.8.1 Transmissão interespécie e potencial zoonótico do rotavírus do grupo C

Na década de 80, Peñaranda et al. (1989) propôs que o RVC humano tivesse sido derivado originalmente a partir de RVC porcino, provavelmente, através de transmissão interespécie (Castello et al., 2000). Existem evidências diretas de que RVC de origem suína são capazes de infectar gado, uma vez que a cepa bovina WD534tc é geneticamente mais semelhante às cepas suínas do as demais cepas bovinas (Chang et al., 1999). Recentemente, Jeong et al. (2009) e Park et al. (2010) demonstraram que a transmissão interespécie entre cepas de RVC de origem bovina e suína parece

ocorrer em alta frequência na natureza na Coreia do Sul. Entretanto, os autores não puderam concluir se ocorreu uma transmissão direta entre as diferentes espécies animais ou se houveram rearranjos entre cepas de origem bovina e suína, uma vez que apenas um pequeno fragmento da proteína VP6 foi analisado. A análise genética do genoma completo é necessária para confirmar tais resultados (Jeong et al., 2009; Park et al., 2010).

Essa transmissão zoonótica aventada na Coreia do Sul pôde ser aventada pelo fato de que as fazendas de porcos e bois estão localizadas na mesma região geográfica (inclusive compartilhando fronteiras entre si), o que facilitaria a transferência de genes. Dessa forma, a transmissão direta de RVC entre gado e porcos ou a geração de rearranjos bovino-suíno poderia ser concebida através do contato direto entre os animais, contaminação através do ambiente (alimento ou água), assim como pelos através dos próprios fazendeiros (Cook et al., 2004; Jeong et al., 2009).

O possível papel zoonótico envolvendo RVC também foi postulado baseado em sua elevada soroprevalência em humanos em áreas rurais, sugestão esta consistente com uma suposta transmissão de origem animal (Iturriza-Gómara et al., 2004a). O padrão de detecção esporádico de RVC nas fezes e a descrição de surtos localizados podem ser interpretados como uma (re-)introdução de cepas de RVC a partir de um reservatório animal não identificado (Bányai et al., 2006). Ainda, a baixa prevalência de anticorpos contra RVC em humanos e a alta prevalência em suínos, também sugere que os RVC possam ser decorrentes de uma infecção zoonótica emergente em humanos (Gouvea et al., 1991).

Uma evidência adicional corroborando o possível potencial zoonótico do RVC foi reportada por Gabbay et al. (2008) a partir de amostras fecais de crianças da região de Belém (Pará) coletadas em 1989, as quais foram infectadas por uma linhagem suína (Cowden). O significado real desse achado permanece obscuro, uma vez que, somente o gene VP6 dessas amostras foi caracterizado e, portanto, não se pode concluir se essas crianças realmente foram infectadas com o RVC suíno ou se houve um rearranjo entre cepas humanas e suínas. Os autores também não obtiveram informações se as crianças infectadas pelas cepas suínas tiveram contato com porcos ou se vivem em áreas onde o contato humano-animal seja mais próximo (Gabbay et al., 2008).

Recentemente, Yamamoto et al (2011) sugeriu uma possível relação filogenética entre a cepa de RVC suína Cowden e cepas humanas, especulando que o gene VP3 de RVC humano pudesse ter origem porcina. A detecção de RVC de origem animal em humanos destacou o potencial impacto zoonótico que tais cepas podem representar, evidenciando a necessidade de um estudo mais aprofundado sobre a epidemiologia dos RVC (Jeong et al., 2009).

1.9.9 Diversidade genética e evolução dos rotavírus do grupo C

A homologia observada entre as sequências das cepas de RVC provenientes de pacientes do mundo todo é muito alta, sugerindo que devam ter sido originadas a partir de um único clone (Castello et al., 2000; Gabbay et al., 2008). Cepas humanas e animais de RVC apresentam sequência nucleotídica relativamente distinta, indicando uma diferença substancial de restrição para hospedeiros e uma via evolucionária independente (Gabbay et al., 2008).

Mudanças nas sequências dos genes VP7 e VP4 dos RVC humanos com o passar dos anos são evidentes, embora sutis, sugerindo que a evolução nos genes de RVC seja mais lenta (Kuzuya et al., 1996; Schnagl et al., 2004) quando comparado aos RVA. Embora todas as cepas humanas de RVC pertençam a um único genótipo (G4) (Jiang et al., 1999), alguns trabalhos sugerem a existência de linhagens circulantes distintas (Rahman et al., 2005a), inclusive no Brasil (Araújo et al., 2010). Vale ressaltar, que o número de cepas de RVC humano sequenciadas até o momento ainda é pequeno e para poder confirmar se o nível de conservação gênica nesses genes é realmente alto, uma quantidade maior de cepas deve ser analisada (Schnagl et al., 2004). Poucos estudos avaliaram as relações genéticas envolvendo a proteína NSP4 dos RVC e, embora alguma variabilidade seja descrita (Yamamoto et al., 2011), as cepas parecem constituir uma linhagem humana única (Bányai et al., 2008; Araújo et al., 2010; Yamamoto et al., 2011).

A variação gênica parece ser maior entre as cepas de RVC de origem animal. A divergência nucleotídica observada por Martella et al. (2007b) na Itália em sequências da proteína VP6 detectadas em porcos é maior que aquelas observadas entre as cepas

humanas. A mesma variabilidade gênica da proteína VP6 também foi observada em cepas de RVC porcinas brasileiras (Médici et al., 2010). Park et al. (2010) demonstraram através de análise filogenética de sequências da proteína VP6 que existe uma diversidade gênica entre cepas de RVC bovinas na Coreia do Sul. Essa diversidade genética observada na proteína VP6, um gene supostamente conservado, abre a possibilidade de que o RVC seja mais variável do que se acreditava inicialmente (Médici et al., 2010).

Os dados genéticos globais acumulados sobre as cepas de RVC se concentram nas sequências de VP7, VP4 e VP6. Informações sobre os demais segmentos gênicos são praticamente inexistentes e o *status* exato da evolução molecular do genoma inteiro de RVC ainda é desconhecido (Yamamoto et al., 2011). O sequenciamento completo de cepas de RVC provenientes da China, Índia, Bangladesh e Japão evidenciaram um alto percentual de conservação, sendo os genes VP6, VP1 e VP2 mais conservados que VP3, NSP4 e NSP5, os quais exibiam uma diversidade genética maior (Yamamoto et al., 2011). O sequenciamento de um maior número de cepas de RVC, tanto de origem humana quanto animal, é essencial para revelar a ecologia desse agente viral, assim como elucidar a origem das cepas de RVC humanas.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O presente trabalho tem como objetivo principal averiguar o potencial zoonótico e a transmissão interespécie de cepas de rotavírus dos grupos A e C.

2.2 Objetivos Específicos

Durante a vigilância nacional dos RV no período compreendido entre Junho de 2007 e Junho de 2012:

(A) Pesquisar a presença de RVA e RVC em amostras fecais de humanos utilizando as técnicas de EIA e EGPA;

(B) Examinar a distribuição de RVA e RVC por idade;

(C) Determinar o padrão de sazonalidade de RVA e RVC;

(D) Caracterizar molecularmente as amostras positivas para RVA quanto aos genótipos G e P;

(E) Descrever a diversidade genotípica das amostras de RVA identificadas;

(F) Sequenciar parcialmente os segmentos genômicos que codificam para as proteínas que compõem o capsídeo externo (VP4 e VP7) de cepas de RVA humano que apresentam combinações G/P não usuais detectadas;

(G) Sequenciar parcialmente os segmentos genômicos que codificam para as proteínas VP4, VP6, VP7 e NSP4 de cepas de RVC humano detectados;

(H) Sequenciar parcialmente os segmentos genômicos que codificam para as proteínas VP4, VP6, VP7 e NSP4 de cepas de RVC humano detectados previamente detectadas pelo NDE em 1988 e 1993;

(H) Comparar as sequências parciais obtidas com sequências cognatas de cepas de RVA e RVC de origem humana e animal disponíveis no *GenBank*;

(I) Analisar geneticamente as cepas de RVA e RVC humanas sequenciadas e as cepas cognatas disponíveis no *GenBank* na tentativa de elucidar as relações genéticas entre cepas de RV provenientes de diferentes espécies hospedeiras.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostragem

Esse é um estudo retrospectivo e descritivo conduzido com amostras fecais de conveniência coletadas de crianças, adultos e idosos provenientes da vigilância nacional de RV. Amostras fecais de pacientes com sintomas de gastroenterite aguda são enviadas ao Núcleo de Doenças Entéricas (NDE) do Centro de Virologia do Instituto Adolfo Lutz. (IAL). O NDE-IAL é centro de referência macrorregional para a vigilância das gastroenterites virais, Ministério da Saúde (MS)-Brasil e participa do Programa de Monitoramento das Doenças Diarreicas Agudas (PMDDA) (Figura 13) com o objetivo de detecção precoce de surtos de diarreia.



Fonte: Morillo et al., 2011

Figura 13. Os estados de Mato Grosso (MT), Tocantins (TO), Goiás (GO), Mato Grosso do Sul (MS), São Paulo (SP), Paraná (PR), Santa Catarina (SC) e o Distrito Federal (DF), destacados em preto no mapa, compõem o conjunto de estados das regiões Sul, Centro-Oeste e Sudeste que atuam na vigilância das gastroenterites virais tendo o NDE-IAL como centro de referência macrorregional.

No período compreendido entre Junho de 2007 e Junho de 2012, o NDE

analisou um total de 6196 amostras de fezes, coletadas de crianças ≤ 5 anos (4213), crianças e adolescentes com idades entre 6 e 18 anos (529), adultos de 19 a 59 anos (1004) e, idosos ≥ 60 anos (202). Entre as 6196 amostras analisadas, 248 não possuíam informações sobre a idade do paciente.

Todas as amostras recebidas pelo NDE são testadas para RVA e permaneceram estocadas em freezer -20°C até o momento da análise. Durante mesmo período, o NDE realizou o diagnóstico diferencial para a detecção de RVC em amostras negativas para RVA. Adicionalmente, foram resgatadas e incluídas todas as amostras positivas para RVC previamente detectadas pelo NDE em 1988 e 1993 para caracterização molecular.

Vale ressaltar que a caracterização molecular dos genótipos de RVA descritos neste estudo foi realizada em amostras coletadas após implantação da vacina Rotarix® no PNI. O presente trabalho não teve por objetivo avaliar a segurança, imunogenicidade ou proteção conferida pela vacinação e, dessa forma não buscou informações relacionadas ao *status* vacinal ou avaliação clínica dos pacientes.

O presente projeto foi previamente encaminhado ao Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz – CEPIAL, São Paulo, Brasil, o qual aprovou seu desenvolvimento em concordância com a Resolução CNS 196/96 e suas resoluções complementares (Ref. 53/05; Ref. 18/09) Este foi um estudo desvinculado e anônimo. Dessa forma, a aplicação do termo de consentimento livre e esclarecido não foi necessária de acordo com a resolução 196/96 sobre pesquisas envolvendo seres humanos - Conselho Nacional de Saúde (CNS) / Ministério da Saúde (MS), Brasília, 1996.

3.2 Preparo da suspensão de fezes

As amostras fecais foram clarificadas em suspensões a 20% (1:5) em tampão Tris (Invitrogen, Carlsbad, CA) / HCl (Merck & Co., Inc, Whitehouse Station, NJ) (Tris/HCl 0,1M; pH 7,4) em microtubos de 1,5 mL ou em tampões comerciais constituintes dos kits de EIA empregados na detecção de RVA. Em seguida as amostras foram agitadas, para garantir a homogeneização, e centrifugadas em

microcentrífuga (Hermle, modelo Z382K) a 5000 x g por 30 minutos (Pereira et al., 1983). Os sobrenadantes foram utilizados nos ensaios de EIA e EGPA. As suspensões fecais foram estocadas a -20°C para, eventualmente, serem utilizadas novamente. Sempre que necessário, novas suspensões foram preparadas seguindo o protocolo descrito acima.

3.3 Ensaio imunoenzimático para rotavírus do grupo A (EIA ou ELISA)

A triagem de amostras positivas para RVA utilizou kits imunoenzimáticos (EIA) comerciais, também chamados de ELISA (*enzyme linked immunoabsorbent assay*). Os EIAs desenvolvidos para o diagnóstico de RVA são do tipo “sanduíche” e detectam o antígeno viral diretamente na amostra (suspensão de fezes) (Coulson e Holmes, 1984; Nakata et al., 1986). Devido ao extenso período de estudo, dois EIAs de marcas diferentes foram utilizados: RIDASCREEN[®] rotavírus (R-Biopharm AG, Darmstadt, Alemanha) e Premier Rotaclone[®] (Meridian Bioscience, Inc., Cincinnati, OH); ambos realizados de acordo com as instruções dos respectivos fabricantes. A marca do EIA utilizado variou conforme a disponibilidade do kit no mercado, entretanto, vale ressaltar que em nenhum momento marcas distintas foram usadas simultaneamente.

De modo resumido: anticorpos monoclonais específicos contra a proteína do capsídeo intermediário VP6 dos RVA (anti-VP6) foram fixados pelo fabricante a um suporte sólido (placas de 48 ou 96 orifícios) e 100µL de cada uma das suspensões fecais, previamente clarificadas, foi adicionado aos orifícios. Às placas também foram adicionados 100µL (2 gotas) de controles positivos e negativos fornecidos pelos kits. Após incubação à temperatura ambiente (20-25°C) (tempo necessário para que o material teste reaja com a fase sólida e foi determinado pelo kit utilizado), as placas foram lavadas manualmente (com tampões de lavagens fornecidos pelo fabricante ou água MilliQ estéril e pelo número de vezes indicado em cada kit) para remover o material em excesso que não reagiu. À cada orifício teste foi adicionado 100µL (2 gotas) de conjugado (anticorpos monoclonais conjugados com enzimas). Após mais uma incubação à temperatura ambiente (20-25°C) e lavagens, 100µL (2 gotas) do substrato da enzima foi adicionado, seguindo-se de nova incubação (à temperatura

ambiente - 20-25°C). Dessa forma, a enzima atua sobre o substrato, produzindo uma mudança de cor. Por meio da adição de 50µL (1 gota) do reagente bloqueador, ocorre uma segunda mudança de cor.

O resultado do teste foi determinado por leitura visual (avaliação qualitativa) e por medida de densidade ótica em espectrofotômetro (Multiskan FC, Thermo Scientific) (avaliação quantitativa) utilizando filtro de comprimento de onda de 450nm. O espectrofotômetro mede a absorbância produzida pela ação da enzima sobre o substrato.

Para os ensaios realizados com o kit RIDASCREEN® foi calculado o valor de *cut off* (valor de corte) acrescentando-se 0,150 ao valor de absorbância obtido na leitura do controle negativo. Para os ensaios realizados com o kit Rotaclone® o valor de *cut off* é fixado pelo fabricante em 0,150. Para ambos os kits, adiciona-se 10% a mais e 10% a menos ao valor de *cut off* de modo a aferir maior confiabilidade e precisão aos testes. Foi considerada positiva a amostra com densidade ótica maior ou igual aos 10% a mais do valor de *cut off* e negativa a amostras com densidade ótica menor ou igual a 10% a menos que o valor de *cut off*. A amostra que apresentou densidade ótica dentro do intervalo de 10% (a mais ou a menos) do *cut off* foi testada novamente após realização de nova clarificação de fezes.

3.4 Eletroforese de RNAdf de rotavírus em gel de poliacrilamida (EGPA ou SDS-PAGE)

EGPA é uma técnica muito utilizada para detecção e estudo de vírus de genoma segmentado, como o RV (RNAdf). Consiste na análise do padrão de migração dos segmentos genômicos virais em gel de poliacrilamida. Esses segmentos podem ser visualizados após coloração do gel, geralmente por nitrato de prata. Esse teste permite a análise de variações no genoma dos RVA detectados por EIA, além da observação de infecções mistas e detecção de RV não pertencentes ao grupo A.

Os RV não pertencentes ao grupo A não são detectados pelos EIAs disponíveis comercialmente e utilizados para a triagem do material. O EGPA utilizado nesse estudo foi realizado a partir de adaptações dos protocolos descritos por Herring et al. (1982) e

Pereira et al. (1983). Amostras negativas para RVA por EIA foram testadas por EGPA para a detecção de RVC.

3.4.1 Extração do ácido nucléico (RNAdf)

Em microtubos de 1,5mL contendo 400µL da suspensão fecal foram adicionados 300µL da mistura de fenol-clorofórmio (1:1 v/v), 50µL de EDTA 0,5M (ácido etilenodiamino tetra-acético) (Gibco® Life Technologies, Carlsbad, CA) e 50µL de SDS 10% (dodecil sulfato de sódio) (Gibco® Life Technologies, Carlsbad, CA). Após agitação por 1 minuto em agitador de tubos e incubação por 10 minutos a temperatura ambiente (20-25°C), as misturas foram centrifugadas a 5000 x g por 2 minutos a 4°C em microcentrifuga refrigerada (Hermle, modelo Z382K). A fase aquosa sobrenadante foi coletada (~500µL) e transferida para um novo microtubo. Foram adicionados, a cada tubo, 1,0mL de etanol absoluto (conservado a -20°C) (Merck & Co., Inc, Whitehouse Station, NJ) e 50µL de NaCl (5M). As misturas foram levemente homogeneizadas manualmente e incubadas por uma noite (*overnight*) a -20°C.

Após a incubação, as misturas foram novamente centrifugadas em microcentrifuga refrigerada (Hermle, modelo Z382K) a 10 000 x g por 15 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram desprezados e os sedimentos foram secos com os tubos na posição invertida à temperatura ambiente (20-25°C) por 10 minutos. Em seguida, os sedimentos foram ressuspensos em 50µL de água MilliQ estéril e armazenados em freezer -20°C.

A cada conjunto de amostras fecais extraídas incluiu-se o extração do RNAdf da cepa padrão SiRV-A/SA11 (controle positivo). SiRV-A/SA11 foi produzida em cultura de células MA104.

3.4.2 Preparo do gel de poliacrilamida

Foram montadas câmaras preparadas com duas placas de vidro separadas entre si por um espaçador de 1mm, seladas com agarose 2% (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO). Às câmaras foram adicionadas duas fases de gel de poliacrilamida: gel

inferior (fase separadora) e gel superior (fase concentradora). O gel inferior é composto por acrilamida 7,5% (Invitrogen, Carlsbad, CA): bisacrilamida 0,2% (Invitrogen, Carlsbad, CA) em tampão Tris/HCL, 3mM pH 8,8; 0,03mM de persulfato de amônia (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO); 0,2% de TEMED (tetrametiletenodiamina) (Invitrogen, Carlsbad, CA). O gel superior é composto por acrilamida 3,5%: bisacrilamida 0,045% em tampão Tris/HCL, 6mM pH 6,8; 0,015mM de persulfato de amônia; 0,2% de TEMED. Após a polimerização dos géis à temperatura ambiente (20-25°C), as placas foram seladas com agarose 2% às cubas de corrida. Em seguida, o sistema de tampão de corrida Tris-glicina (Tris 0,01M; glicina 0,083M; pH 8,3) foi adicionado aos seus respectivos reservatórios.

3.4.3 Preparo das amostras para corrida em gel de poliacrilamida

Para a dissociação do RNAdf, 15µL de cada amostra foram misturados a 5µL de tampão dissociante: uréia 5M (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO), 2-mercaptoetanol 5% (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO), azul de bromofenol 1% (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO), SDS 10% e Tris/HCl 0,5M. Em seguida foram incubados a 56 °C por 15 minutos.

3.4.4 Corrida eletroforética em gel de poliacrilamida

Após a retirada dos pentes das câmaras de eletroforese, cada amostra a ser analisada foi aplicada em uma canaleta individual para a corrida eletroforética. A eletroforese dos segmentos de RNA ocorreu em corrente constante de 40mA (milliampere), durante 1,5 hora à temperatura ambiente (20-25°C). Em todas as corridas eletroforéticas a amostra padrão (controle positivo) SiRV-A/SA11 foi incluída.

3.4.5 Coloração do gel de poliacrilamida

Para a coloração com nitrato de prata, inicialmente cada gel foi transferido para uma solução fixadora composta por etanol 10% e ácido acético 0,5%, seguindo-se de agitação por 30 minutos em agitador orbital (Fanen, modelo 255-B) à temperatura

ambiente (20-25°C). Após a agitação, a solução fixadora foi retirada, o gel lavado 2 x com água MilliQ e a solução de coloração composta por nitrato de prata 0,11M foi adicionada. Após mais 30 minutos de agitação periódica em agitador orbital à temperatura ambiente (20-25°C), o gel foi novamente lavado 2x com água MilliQ, em seguida, acrescentou-se a solução reveladora composta por hidróxido de sódio (NaOH) 0,75M e formalina 0,95%. Após a visualização das bandas, a revelação foi interrompida removendo-se a solução reveladora e acrescentando-se a solução de ácido acético 5% por 10 minutos à temperatura ambiente (20-25°C).

3.4.6 Secagem do gel de poliacrilamida

Para a secagem do gel, inicialmente desprezou-se a solução de ácido acético 5% e adicionou-se a solução de secagem (metanol 65%, etanol 10%, glicerol 0,5%). Duas folhas de celofane (GE Healthcare Bio-Sciences Corp, modelo Precut Cellophan Sheet) foram embebidas nesta solução. Uma das folhas foi usada para cobrir a placa de acrílico, em seguida, o gel foi colocado sobre a placa revestida com a folha de celofane. A segunda folha de celofane foi colocada sobre o gel, cobrindo-o totalmente. As folhas de celofane foram bem esticadas (sem deixar nenhuma bolha de ar entre elas ou entre as mesmas e o gel) e presas com presilhas de acrílico à placa. O conjunto de secagem foi deixado em repouso por dois dias à temperatura ambiente (20-25°C). Após esse período, o conjunto foi desmontado e o gel aprisionado pelas folhas de celofane, totalmente secas, retirado. O gel de poliacrilamida seco pode ser armazenado à temperatura ambiente (20-25°C) por tempo indeterminado.

3.4.7 Foto-documentação do gel de poliacrilamida

Para fotografar os géis, antes ou depois da secagem, utilizou-se o sistema de foto-documentação digital *UV Transiluminator*, UVP Laboratory Products, sem a aplicação de luz ultravioleta (UV). As fotografias foram impressas, analisadas e arquivadas.

3.4.8 Interpretação dos resultados de eletroforese em gel de poliacrilamida

As amostras positivas para RVA foram analisadas quanto ao comportamento de migração eletroforética dos segmentos de RNAdf, visando a classificação das mesma em “perfil longo” ou “perfil curto”, quando comparadas a amostra padrão SiRV-A/SA11. Eventualmente, amostras positivas para RVA por EIA podem não ter seus segmentos de RNAdf visualizados em EGPA (amostra negativa para EGPA), uma vez que essa metodologia requer genoma íntegro e a presença de pelo menos 10^8 a 10^{10} partículas virais para a obtenção de um resultado positivo (Jiang et al., 1995; Kuzuya et al., 1996; Gabbay et al., 2008).

As amostras foram consideradas positivas para RVC quando o padrão de migração dos segmentos de RNAdf 4-3-2-2, característico desse grupo de RV, foi observado utilizando a amostra padrão SiRV-A/SA11 como base de comparação.

3.5 Transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase e subsequente re-amplificação com iniciadores (primers) múltiplos (*semi-nested multiplex* RT-PCR) para rotavírus do grupo A

Para a identificação da diversidade de genótipos G e P das amostras positivas para RVA (detectadas simultaneamente pelas técnicas de triagem EIA e EGPA) foi realizado o RT-PCR com a transcrição reversa do RNAdf seguida de amplificação de acordo com os protocolos descritos por Gouvea et al. (1990), Gentsch et al. (1992), Gouvea et al. (1994a), Gouvea et al. (1994b) e Gouvea et al. (1994c). A *multiplex* PCR inclui mais de um conjunto de primers, possibilitando a detecção de múltiplos alvos (genótipos G e P) na mesma reação, diminuindo o custo e otimizando a genotipagem das amostras.

Em todas as reações foram incluídos controles positivos (amostras positivas detectadas e genotipadas previamente pelo NDE oriundas da rotina diagnóstica) e negativos (água MilliQ estéril). Vale ressaltar, que durante a realização da RT-PCR foram utilizados laboratórios diferentes para as etapas de extração do RNAdf, preparo da transcrição reversa e primeira amplificação, denominadas áreas de pré-amplificação

e para as etapas de transferência do DNA amplificado para a segunda reação de PCR, preparo e corrida do gel de agarose e documentação digital do resultado obtido, denominadas áreas de pós-amplificação.

Os diferentes primers usados para a 1ª reação de amplificação dos genes que codificam para as proteínas VP7 e VP4 e aqueles utilizados para a genotipagem (2ª reação de amplificação) das amostras de RVA estão descritos nas Tabelas 4 e 5, bem como suas respectivas posições de anelamento, sequências de nucleotídeos, amostra usada como protótipo de genótipo e referência bibliográfica.

Tabela 4. Sequência de nucleotídeos dos primers utilizados na caracterização de genótipos G da proteína VP7 dos RVA, suas respectivas posições de anelamento, amostra usada como protótipo e referência bibliográfica.

Primer	Posição	Sequência (5´-3´)	Protótipo	Genótipos G	Polaridade	Referência Bibliográfica
Beg9	1-28	GGCTTTAAAAGAGAGAATTTCCGTCTGG	HuRV-A/Wa	*	(+)	Gouvea et al., 1990
End9	1062-1036	GGTCACATCATAACAATTCTAATCTAAG	SiRV-A/SA11	*	(-)	Gouvea et al., 1990
RVG9	1062-1044	GGTCACATCATAACAATTCT	SiRV-A/SA11	*	(-)	Gouvea et al., 1990
sBeg9 (Anti-A1)	1-21	GGCTTTAAAAGAGAGAATTTTC	HuRV-A/Wa	*	(+)	Gouvea et al., 1994b
aBT1	314-335	CAAGTACTCAAATCAATGAGG	HuRV-A/Wa	G1	(+)	Gouvea et al., 1990
aCT2	411-435	CAATGATATTAACACATTTTCTGTG	HuRV-A/DS1	G2	(+)	Gouvea et al., 1990
aET3	689-709	CGTTTGAAGAAGTTGCAACAG	HuRV-A/P	G3	(+)	Gouvea et al., 1990
aDT4	480-498	CGTTTCTGGTGAGGAGTTG	HuRV-A/ST3	G4	(+)	Gouvea et al., 1990
FT5	779-760	CATGTACTCGTTGTTACGTC	PoRV-A/OSU	G5	(-)	Gouvea et al., 1994c
DT6	499-481	CTAGTTCCTGTGTAGAATC	BoRV-A/UK	G6	(-)	Gouvea et al., 1994c
HT8	273-256	CGGTTCCGGATTAGACAC	HuRV-A/B37	G8	(-)	Gouvea et al., 1994c
aFT9	757-776	CTAGATGTAACTACAACACTAC	HuRV-A/WI61	G9	(-)	Gouvea et al., 1990
ET10	714-697	TTCAGCCGTTGCGATTTC	BoRV-A/B223	G10	(-)	Gouvea et al., 1994c
BT11	366-316	GTCATCAGCAATCTGAGTTGC	PoRV-A/YM	G11	(-)	Gouvea et al., 1994c
VG86	436-459	TTACAGAGAAGGACGCTATGTCA	L26	G12	(-)	Taniguchi et al., 1990

*Amplifica todo o gene 9 que codifica para a proteína VP7 (para todos os genótipos)

Tabela 5. Sequência de nucleotídeos dos primers utilizados na caracterização de genótipos P da proteína VP4 dos RVA, suas respectivas posições de anelamento, amostra usada como protótipo e referencia bibliográfica.

Primer	Posição	Sequência (5´-3´)	Protótipo	Genótipos P	Polaridade	Referência Bibliográfica
Con3	11-32	TGGCTTCGCTACTTTATAGACA	HuRV-A/KU	*	(+)	Gentsch et al., 1992
Con2	868-887	ATTTCCGGACCACTTTATAACC	HuRV-A/KU	*	(-)	Gentsch et al., 1992
pNCDV	269-289	CGAACGCGGGGGTGGTAGTTG	BoRV-A/NCDV	[1]	(+)	Gouvea et al., 1994b
BL-36	736-759	TGATTGAGCTTTAATGATATCAC	HuRV-A/HCR3	[3]	(-)	Li et al., 1993
2T.1	474-494	CTATTGTTAGAGGTTAGAGTC	HuRV-A/RV5	[4]	(-)	Gentsch et al., 1992
pUK	336-354	GCCAGGTGTCGCATCAGAG	BoRV-A/UK	[5]	(+)	Gouvea et al., 1994b
pGott	465-487	GCTTCAACGTCCTTTAACATCAG	PoRV-A/Gott	[6]	(+)	Gouvea et al., 1994b
3T.1	259-278	TGTTGATTAGTTGGATTCAA	HuRV-A/1076	[6]	(-)	Gentsch et al., 1992
pOSU	389-412	CTTTATCGGTGGAGAATACGTCAC	PoRV-A/OSU	[7]	(+)	Gouvea et al., 1994b
1T.1	339-356	TCTACTTGGATAACGTGT	HuRV-A/KU	[8]	(-)	Gentsch et al., 1992
4T.1	385-402	TGAGACATGCCATTGGAC	HuRV-A/K8	[9]	(-)	Gentsch et al., 1992
5T.1	575-594	ATCATAGTTAGTAGTCGGG	HuRV-A/69M	[10]	(-)	Gentsch et al., 1992
Pb223	574-594	GGAACGTATTCTAATCCGGTG	BoRV-A/B223	[11]	(+)	Gouvea et al., 1994b

*Amplifica parcialmente o gene 4 que codifica para a proteína VP4 (para todos os genótipos)

3.5.1 Extração do ácido nucléico (RNAdf)

A extração do RNAdf foi realizado seguindo-se duas metodologias distintas: (i) utilizando TRIzol[®] *Reagent* (Invitrogen, Carlsbad, CA) (libera o RNAdf através do rompimento da cápside da partícula viral) de acordo com as instruções do fabricante e seguindo-se o protocolo descrito por Chomczynski e Sacchi (1987) e (ii) utilizando QIAamp[®] *Viral RNA Mini Kit* (Qiagen, Inc., Valencia, CA) segundo as instruções do fabricante. Esse kit usa colunas de centrifugação compostas por sílica-gel que visam aumentar as chances de extração e concentração de pequenas quantidades de ácido nucléico. Os diferentes métodos de extração não foram utilizados simultaneamente. Esses métodos foram usados de acordo com a disponibilidade dos reagentes.

3.5.1.1 Extração do ácido nucléico com TRIzol[®] *Reagent*

Em microtubos de 1,5mL, suspensões fecais 10% em TRIzol[®] (alíquota de fezes *in natura* em 1000µL de TRIzol[®]) foram homogeneizadas utilizando agitador de tubos (FANEN, modelo 251) e incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente (20-25°C). Após esse período foram adicionados 200µL de clorofórmio, seguida de agitação manual vigorosa e incubados novamente à temperatura ambiente (20-25°C) por 3 minutos para ocorrer a separação da fase aquosa que contem o RNAdf. Após a incubação, os tubos foram centrifugados por 15 minutos em microcentrifuga (Hettich zentrifugen, modelo Mikro20) a 12 000 x g. O sobrenadante (~500µL) foi transferido para um novo tubo, adicionou-se 500µL de álcool isopropílico (isopropanol) e incubou-se a mistura por 10 minutos à temperatura ambiente (20-25°C) para promover a precipitação do RNAdf.

Os tubos foram novamente centrifugados em microcentrifuga (Hettich zentrifugen, modelo Mikro20) por 10 minutos a 12 000 x g. O sobrenadante foi descartado e, em seguida, o sedimento (*pellet*) foi lavado com 1000µL de etanol 75%. A mistura foi centrifugada por 5 minutos a 12 000 x g em microcentrifuga (Hettich zentrifugen, modelo Mikro20). O sedimento (RNAdf extraído) foi seco à temperatura ambiente (20-25°C) pela inversão do microtubo em papel absorvente por 10 minutos. O RNAdf seco foi ressuspenso em 40µL de água MilliQ estéril e incubado a 55°C em bloco térmico (Lab-Line, modelo Multi-Blok Heater) por 10 minutos. O RNAdf extraído foi estocado em freezer -20°C.

3.5.1.2 Extração do ácido nucléico com QIAamp[®] Viral RNA Mini Kit

Um volume de 140µL de suspensão de fezes clarificadas foi adicionado e gentilmente homogeneizado em microtubos contendo 560µL do tampão AVL e 5,6µL de *RNA Carrier*. As misturas foram incubadas à temperatura ambiente (20-25°C) por 10 minutos. Após uma centrifugação rápida (*spin*) em microcentrifuga (Hettich zentrifugen, modelo Mikro20), 560µL de etanol absoluto foi adicionado. As misturas foram homogeneizadas vigorosamente em agitador de tubos e centrifugadas rapidamente.

Aos tubos contendo a coluna de sílica-gel foram adicionados 630µL da mistura, seguindo-se de centrifugação a 8 000 x g por 1 minuto em microcentrifuga (Hettich

zentrifugen, modelo Mikro20) para permitir a ligação do RNAdf ao filtro. O tubo coletor acoplado à coluna de sílica-gel e contendo o filtrado foi descartado e substituído por um novo. Os 630µL restantes da mistura foram adicionados à coluna e o procedimento descrito anteriormente foi repetido novamente. Foram adicionados 500µL do tampão AW1 à coluna para lavagem do RNAdf, seguindo-se de centrifugação a 8 000 x g por 1 minuto em microcentrifuga (Hettich zentrifugen, modelo Mikro20). O tubo coletor foi descartado e substituído novamente. Foram adicionados 500µL de tampão AW2 à coluna, seguindo-se de centrifugação a 12 000 x g por 3 minutos em microcentrifuga (Hettich zentrifugen, modelo Mikro20).

O coletor contendo o filtrado foi descartado, substituído por um novo e repetiu-se centrifugação de 12 000 x g por 1 minuto. O tubo coletor foi descartado e substituído por um microtubo. Finalmente, foi adicionado 60µL de tampão AVE à coluna, seguindo-se de incubação por 1 minuto à temperatura ambiente (20-25°C) e centrifugação a 8 000 x g por 1 minuto em microcentrifuga (Hettich zentrifugen, modelo Mikro20). A coluna foi descartada e o filtrado obtido no microtubo contendo o RNAdf extraído foi armazenado em freezer -20°C.

3.5.2 Desnaturação do ácido nucléico

Em microtubos de 500µL contendo 3µL de DMSO (dimetilsulfóxido) (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO) foram distribuídos 5µL de cada amostra (incluindo controle positivo e negativo), seguindo-se de aquecimento à 93°C em bloco térmico (LabLine, modelo Multi-Beak Heather) por 3 minutos para a desnaturação do RNAdf. Após incubação, as amostras foram imediatamente transferidas para um recipiente contendo gelo (banho de gelo), permanecendo por no mínimo 5 minutos. As amostras não genotipadas foram reprocessadas utilizando o mesmo protocolo descrito acima utilizando diferentes quantidades de RNA (3uL e/ou 10uL).

3.5.3 RT-PCR: primeira amplificação dos genes que codificam para as proteínas VP7 e VP4

Cada RNAdf extraído e previamente desnaturado foi utilizado como molde para a transcrição reversa, seguida da primeira amplificação do cDNA dos genes 9 e 4 que codificam para as proteínas VP7 e VP4, respectivamente. A amplificação de cada gene é realizada de forma independente e em microtubos individuais. A esses tubos contendo RNAdf desnaturado foi acrescentado 42µL da mistura de reagentes de PCR (*master mix*). Para os volumes de 3uL e 10uL de RNAdf foram acrescentados 44uL e 37uL de mistura de reagentes de PCR, respectivamente.

A mistura da RT-PCR foi composta de 1,25mM de cada deoxinucleotídeo (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) (Invitrogen, Carlsbad, CA); 0,5X de tampão 10X concentrado (Invitrogen, Carlsbad, CA); 1,25mM solução de cloreto de magnésio (MgCl₂) (Invitrogen, Carlsbad, CA); 20µM do *pool* de primer Beg9-End9 para amplificação da proteína VP7 ou 20µM do *pool* de primer Con2-Con3 para amplificação da proteína VP4 (Invitrogen, Carlsbad, CA); 2,5 U *Super Script® II Reverse Transcriptase* (Invitrogen, Carlsbad, CA); 1 U *Platinum Taq DNA Polimerase* (Invitrogen, Carlsbad, CA) e água MilliQ estéril. O preparo da mistura foi realizado no gelo e completou-se o volume final de 50µL após adição da amostra desnaturada.

Os microtubos foram levados ao termociclador (Perkin Elmer Cetus, modelo GeneAmp PCR System 9600), o qual foi programado para incubação inicial de 42°C por 60 minutos para a transcrição reversa. Após a RT, seguiu-se a reação de amplificação em 30 ciclos (94°C por 1 minuto, 42°C por 2 minutos, 72°C por 1 minuto) e extensão final à 72°C por 5 minutos.

3.5.4 Semi-nested multiplex PCR dos genes que codificam para as proteínas VP7 e VP4 (Genotipagem)

A genotipagem dos produtos da RT-PCR foi realizada pelo método de *semi-nested multiplex* PCR. Os produtos da primeira amplificação foram usados como molde para a segunda amplificação, utilizando *pool* de primers que amplificam regiões variáveis do gene VP7 (genótipos G) e do fragmento do gene VP4 (genótipos P). A genotipagem de cada gene é realizada de forma independente e em microtubos individuais.

Em microtubos foi realizada a mistura para PCR (*master mix*) contendo: 1,25mM de cada deoxinucleotídeo (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) (Invitrogen, Carlsbad, CA); 0,5x de tampão 10x concentrado (Invitrogen, Carlsbad, CA); 1,25mM solução de cloreto de magnésio (MgCl₂) (Invitrogen, Carlsbad, CA); 20μM do *pool* de primer específicos para VP7 ou 20μM do *pool* de primer específicos VP4 (Invitrogen, Carlsbad, CA); 1 U *Platinum Taq DNA Polimerase* (Invitrogen, Carlsbad, CA) e água MilliQ estéril. O preparo da mistura é realizado em banho de gelo e deve completar volume final de 25μL após adição de 1μL do produto obtido na primeira amplificação.

Os microtubos foram levados ao termociclador (Perkin Elmer Cetus, modelo GeneAmp PCR System 9600,), o qual foi programado para amplificação em 25 ciclos (94°C por 1 minuto, 55°C por 2 minutos, 72°C por 1 minuto) e extensão final à 72°C por 5 minutos.

3.5.5 Eletroforese em gel de agarose

Os produtos amplificados (*amplicons*) foram submetidos à eletroforese em gel de agarose à 1,2% (Invitrogen, Carlsbad, CA) diluída em 100mL de tampão TBE 1x (Tris-ácido bórico-EDTA; pH 8,0). Adicionou-se 3μL de brometo de etídio (Invitrogen, Carlsbad, CA) ou 6μL de GelRed™ *Nucleic Acid Gel Stain* (Biotium, Inc., CA, EUA) (Sambrook et al., 1989) de acordo com a disponibilidade do reagente. O gel foi preparado em cubas de eletroforese horizontal e as canaletas foram formadas com a adição de um pente. Depois da solidificação, o gel foi colocado em cuba horizontal de eletroforese contendo tampão de corrida TBE 1x e o pente foi retirado. Um volume de 7μL do produto amplificado foi misturado com 3μL de tampão de aplicação (azul de bromofenol 1% acrescido de sacarose) e aplicado a cada canaleta correspondente. Um volume de 4μL do marcador de peso molecular (100pb *DNA Ladder*, Invitrogen, Carlsbad, CA) acrescido de 3μL de tampão de aplicação também foi aplicado às canaletas controle. O sistema de corrida foi submetido a uma corrente elétrica constante de 150V por 50 minutos (após a primeira amplificação) ou 120V por 60 minutos (após a segunda amplificação).

3.5.6 Fotodocumentação do gel de agarose

Após a eletroforese, os produtos obtidos foram observados em transiluminador de luz ultravioleta (UV). A imagem gerada foi captada pelo sistema de fotodocumentação digital *UV Transiluminator, UVP Laboratory Products*. A imagem salva foi impressa, analisada e arquivada.

3.5.7 Interpretação dos resultados

A positividade de cada amostra testada na primeira amplificação e o respectivo genótipo foram definidos pelos diferentes tamanhos dos fragmentos obtidos (Tabela 6, Figuras 14 e 15). O tamanho de cada segmento foi estabelecido por comparação com o peso molecular. As amostras que amplificaram segmentos de tamanhos diferentes aos esperados e/ou com características de dois ou mais genótipos foram testadas novamente em reações contendo um único primer específico de cada genótipo. Dessa forma foi possível revelar a presença de mais de um genótipo ocorrendo ao mesmo tempo em uma amostra, assim como verificar a ocorrência de uma eventual contaminação ou ampliações inespecíficas.

Tabela 6. Tamanho dos segmentos produzidos pela RT-PCR (1ª amplificação) para os genes que codificam as proteínas VP7 e VP4 e dos segmentos produzidos pela *semi-nested multiplex* PCR (2ª amplificação) para cada um dos genótipos G e P de RVA testados com seus respectivos primers.

Primer	Genótipo	Tamanho do segmento (pb)
Beg9/End9	*	1062
Con2/Con3	*	876
aBT1/RVG9	G1	749
aCT2/RVG9	G2	652
aET3/RVG9	G3	374
aDT4/RVG9	G4	583
FT5/Anti-A1	G5	780
DT6/Anti-A1	G6	500
HT8/Anti-A1	G8	274
aFT9/RVG9	G9	306
ET10-/nti-A1	G10	715
BT11/Anti-A1	G11	337
VG86/Anti-A1	G12	436
pNCDV/Con2	P[1]	622
BL-36/Con3	P [3]	748
2T.1/Con3	P [4]	483
pUK/Con2	P [5]	555
3T.1/Con3	P [6]	267
pGott/Con2	P [6]	432
pOSU/Con2	P [7]	502
1T.1/Con3	P [8]	345
4T.1/Con3	P [9]	391
5T.1/Con3	P [10]	583
pB223/Con2	P [11]	314

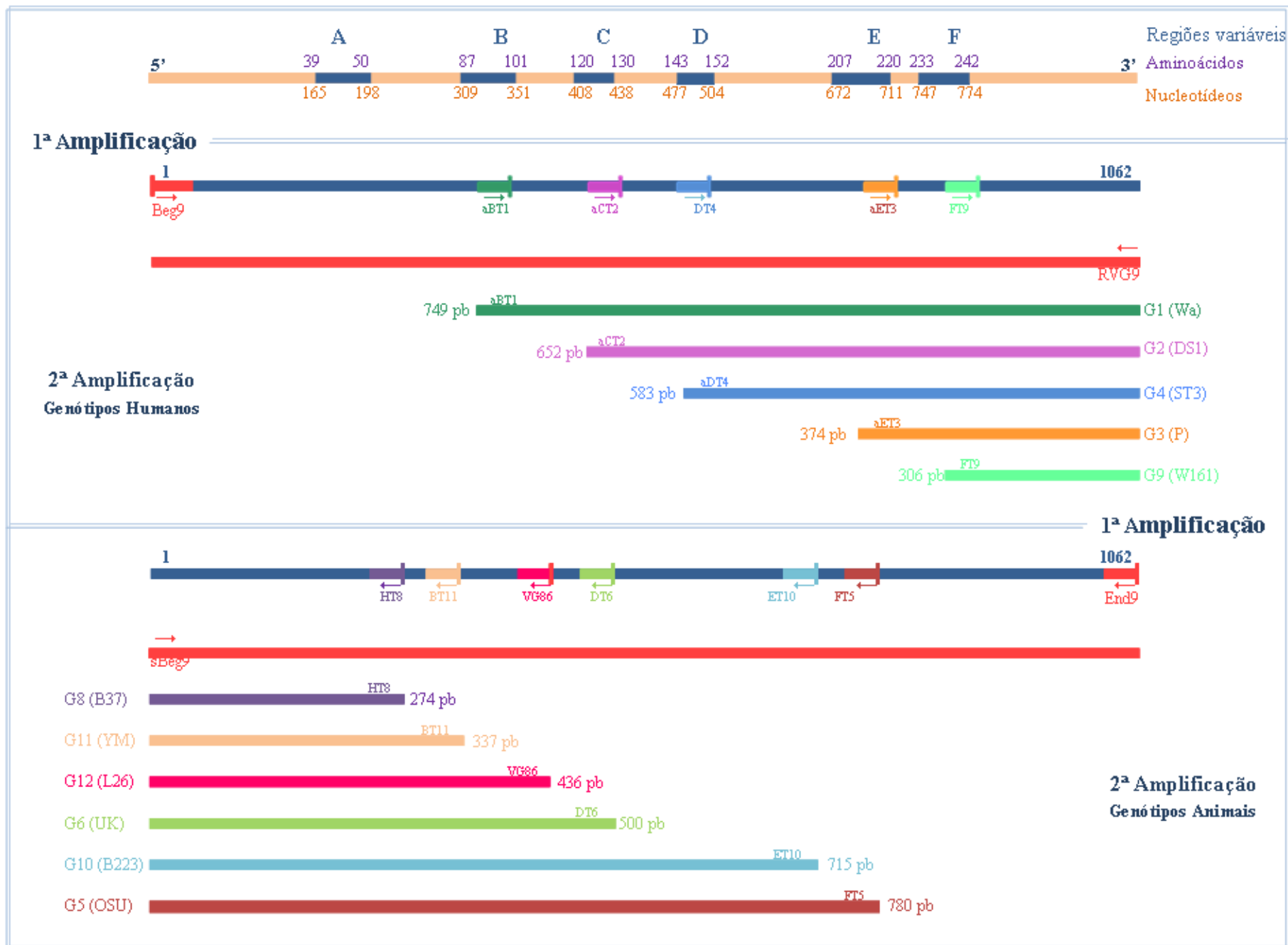


Figura 14. Representação esquemática do gene que codifica para a proteína VP7 dos RVA. A figura exibe a localização das regiões variáveis, posição dos primers, tamanho dos respectivos produtos de PCR amplificados e os genótipos correspondentes.

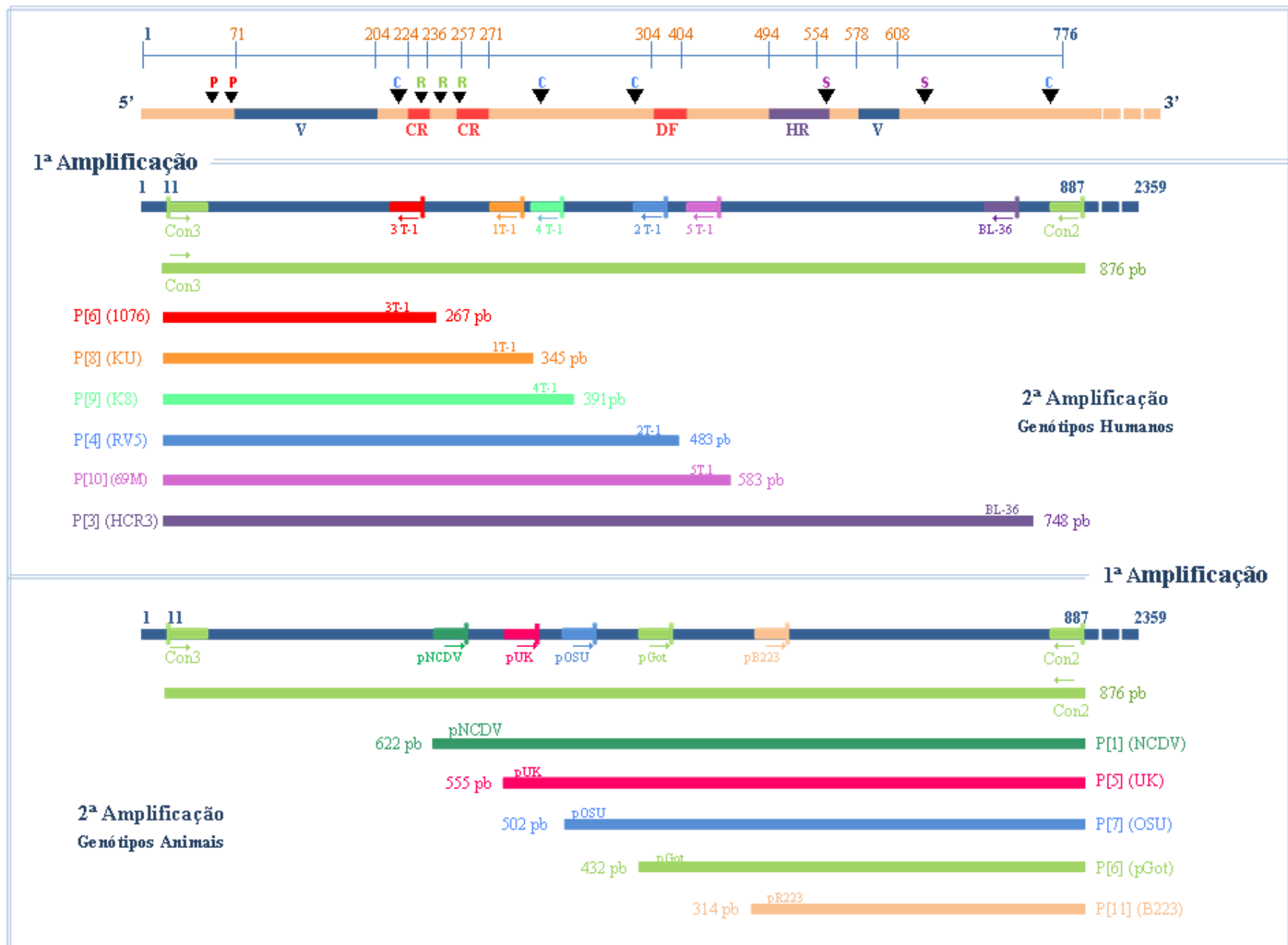


Figura 15. Representação esquemática do gene que codifica para a proteína VP4 dos RVA. A figura exibe a localização das regiões variáveis, posição dos primers, tamanho dos respectivos produtos de PCR amplificados e os genótipos correspondentes.

3.6 Transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (*one step* RT-PCR) e subsequente re-amplificação (*semi-nested* PCR) para rotavírus do grupo C

Para a caracterização molecular das amostras positivas para RVC (detectadas pela técnica de triagem EGPA) foi realizado a RT-PCR com a transcrição reversa do RNAdf seguida de amplificação de acordo com os protocolos descritos por Gouvea et al. (1991) e Sánchez-Fauquier et al. (2003). Em todas as reações foram incluídos controles positivos (amostras positivas detectadas previamente pelo NDE oriundas da rotina diagnóstica) e negativos (água MilliQ estéril). Vale ressaltar, que durante a realização da RT-PCR foram utilizados laboratórios diferentes para as etapas de extração do RNAdf, preparo da transcrição reversa e primeira amplificação, denominadas áreas de pré-amplificação e para as etapas de transferência do DNA amplificado para a segunda reação de PCR, preparo e corrida do gel de agarose e documentação digital do resultado obtido, denominadas áreas de pós-amplificação.

A reação de *semi-nested* PCR para RVC foi estabelecida e descrita na literatura para os genes que codificam as proteínas VP6 e VP7 (Gouvea et al., 1991; Sánchez-Fauquier et al., 2003), onde são utilizados diferentes primers para a 1ª e 2ª reação de amplificação. Para a amplificação dos genes que codificam as proteínas VP4 e NSP4 dos RVC foi realizado apenas a 1ª amplificação (*one step* RT-PCR). Os primers usados nas reações de amplificação das amostras positivas para RVC estão descritos nas Tabelas 7 e 8, assim como suas respectivas posições de anelamento, sequências de nucleotídeos e referência bibliográfica.

Tabela 7. Sequência de nucleotídeos dos primers utilizados na caracterização molecular das proteínas VP4, VP6, VP7 e NSP4 dos RVC, suas respectivas posições de anelamento e referencia bibliográfica.

Primer	Posição	Sequência (5´-3´)	Polaridade	Amplificação	Proteína	Referência Bibliográfica
BMJ-13	---	AGCCACATGATCTTGTTT	(+)	RT-PCR	VP7	Sánchez-Fauquier et al., 2003; Nilsson et al., 2000b
BMJ-107	546-563	TGTTTGGAGATGTGATGA	(-)	RT-PCR	VP7	Sánchez-Fauquier et al., 2003; Teixeira et al., 1998
BMJ-27	---	CAGATGAACACTGCTCAA	(+)	<i>semi-nested</i> PCR	VP7	Sánchez-Fauquier et al., 2003
BMJ-143	---	CATGATCTTGTTTACGCAT	(-)	<i>semi-nested</i> PCR	VP7	Sánchez-Fauquier et al., 2003
GrCVP4-1F	1-20	GGCTTAAAAAGTAGAGATCG	(+)	RT-PCR	VP4	Rahman et al., 2005a
GrCVP4-1243R	1224-1243	CCAGGATATGATCCTAGAGG	(-)	RT-PCR	VP4	Rahman et al., 2005a
HCVP4Aa	2264-2283	AGCCACATTATTGAGATCTC	(-)	RT-PCR	VP4	Mitui et al., 2009
314VP4R otaCBeg	314-333	AAAGCATGGTCCAGACACTT	(+)	RT-PCR	VP4	Mitui et al., 2009
NSP4 sense	14-35	TCAGATCACTTTGCTCTAGGAA	(+)	RT-PCR	NSP4	Bányai et al., 2006
NSP4 antisense	571-591	TACATTGATCCTCAACTCAGC	(-)	RT-PCR	NSP4	Bányai et al., 2006
NSP4-1F	1-20	GGCTTTAAATTTTTCAGATC	(+)	RT-PCR	NSP4	Mitui et al., 2009
NSP4-613-R	594-613	AGCCACATGAATTTTTCATA	(-)	RT-PCR	NSP4	Mitui et al., 2009
C1	994-1016	CTCGATGCTACTACAGAATCAG	(+)	RT-PCR	VP6	Gouvea et al., 1991
C4	1325-1349	AGCCACATAGTTCACATTTTCATCC	(-)	RT-PCR	VP6	Gouvea et al., 1991
C3	1300-1320	GGGATCATCCACGTCATGCG	(-)	<i>semi-nested</i> PCR	VP6	Gouvea et al., 1991

Tabela 8. Tamanho dos segmentos produzidos pelas reações de RT-PCR e *semi-nested* PCR para cada uma das proteínas de RVC testadas e seus respectivos primers.

Primers	Proteína	Tamanho do segmento (pb)	Amplificação
BMJ13/BMJ107	VP7	543	RT-PCR
BMJ27/BMJ143	VP7	284	<i>semi-nested</i> PCR
GrCVP4-1F/GrCVP4-1243R	VP4	1 241	RT-PCR
HCVP4Aa/314VP4RotaCBeg	VP4	1950	RT-PCR
NSP4 sense/ NSP4 antisense	NSP4	556	RT-PCR
NSP4-1F/ NSP4-613-R	NSP4	593	RT-PCR
C1/C4	VP6	356	RT-PCR
C1/C3	VP6	327	<i>semi-nested</i> PCR

3.6.1 Extração do ácido nucléico com *QIAamp*[®] *Viral RNA Mini Kit*

A extração do ácido nucléico com *QIAamp*[®] *Viral RNA Mini Kit* foi realizado segunda a descrição feita no item 4.5.1.2.

3.6.2 Desnaturação do ácido nucléico

A desnaturação do ácido nucléico foi realizada segundo a descrição feita no item 4.5.2.

3.6.3 RT-PCR: primeira amplificação dos genes que codificam para as proteínas VP4, VP6, VP7 e NSP4

Cada RNAdf extraído e previamente desnaturado foi utilizado como protótipo para a transcrição reversa, seguida da primeira amplificação do cDNA dos genes que codificam para as proteínas VP4, VP6, VP7 e NSP4. A amplificação de cada gene é realizada de forma independente e em microtubos individuais. A esses tubos contendo RNAdf desnaturado foi acrescentado 37µL, 42µL ou 44µL da mistura de reagentes de PCR (*master mix*), dependendo do volume de RNAdf utilizado como molde (10µL, 5µL

ou 3µL), respectivamente, da mesma forma como foi descrito para o RNA nos itens 3.5.2 e 3.5.3..

A mistura da RT-PCR foi composta de 1,25mM de cada deoxinucleotídeo (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) (Invitrogen, Carlsbad, CA); 0,5X de tampão 10X concentrado (Invitrogen, Carlsbad, CA); 1,25mM solução de cloreto de magnésio (MgCl₂) (Invitrogen, Carlsbad, CA); 20µM do *pool* de primer específicos para VP4, VP6, VP7 ou NSP4 (Invitrogen, Carlsbad, CA); 2,5 U *Super Script® II Reverse Transcriptase* (Invitrogen, Carlsbad, CA); 1 U *Platinum Taq DNA Polimerase* (Invitrogen, Carlsbad, CA) e água MilliQ estéril. O preparo da mistura foi realizado em banho de gelo e completou-se para o volume final de 50µL após adição da amostra desnaturada.

Os microtubos foram levados ao termociclador (Perkin Elmer Cetus, modelo GeneAmp PCR System 9600), o qual foi programado para incubação inicial de 42°C por 60 minutos para a ação da transcriptase reversa. Após a RT, seguiu-se a reação de amplificação em 30 ciclos (94°C por 1 minuto, 42°C por 2 minutos, 72°C por 1 minuto) e extensão final à 72°C por 5 minutos.

3.6.4 *Semi-nested* PCR dos genes que codificam para as proteínas VP6 e VP7

A re-amplificação dos produtos da RT-PCR dos genes que codificam para as proteínas VP6 e VP7 foi realizada pelo método de *semi-nested* PCR. Os produtos da primeira amplificação foram utilizados como molde para a segunda amplificação. A re-amplificação de cada gene é realizada de forma independente e em microtubos individuais.

Em microtubos foi realizada a mistura para PCR (*master mix*) contendo: 1,25mM de cada deoxinucleotídeo (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) (Invitrogen, Carlsbad, CA); 0,5x de tampão 10x concentrado (Invitrogen, Carlsbad, CA); 1,25mM solução de cloreto de magnésio (MgCl₂) (Invitrogen, Carlsbad, CA); 20µM do *pool* de primer VP6 ou VP7 (Invitrogen, Carlsbad, CA); 1 U *Platinum Taq DNA Polimerase* (Invitrogen, Carlsbad, CA) e; água MilliQ estéril. O preparo da mistura é realizado em banho de gelo e deve completar volume final de 25µL após adição de 1µL do produto obtido na primeira amplificação.

Os microtubos foram levados ao termociclador (Perkin Elmer Cetus, modelo GeneAmp PCR System 9600), o qual foi programado para amplificação em 25 ciclos (94°C por 1 minuto, 55°C por 2 minutos, 72°C por 1 minuto) e extensão final à 72°C por 5 minutos.

3.6.5 Eletroforese em gel de agarose

A eletroforese em gel de agarose foi realizada segundo a descrição feita no item 4.5.5.

3.6.6 Fotodocumentação do gel de agarose

A foto-documentação do gel de agarose foi realizada segundo a descrição feita no item 4.5.6.

3.6.7 Interpretação dos resultados

A positividade de cada amostra testada na 1^a e/ou 2^a amplificação foi definida pelo tamanho dos fragmentos obtidos (Tabela 8). O tamanho de cada segmento representa a amplificação parcial do gene e foi estabelecido por comparação com o peso molecular. As amostras que amplificaram segmentos de tamanhos inespecíficos foram testadas novamente para verificar a ocorrência de uma eventual contaminação.

3.7 Sequenciamento genético

Foram submetidas ao sequenciamento de nucleotídeos dos segmentos correspondentes às proteínas VP7 e VP4 as amostras de RVA que exibiram combinações de genótipos não usuais pela genotipagem por *semi-nested multiplex* RT-PCR detectadas durante o período de estudo (Junho de 2007 a Junho de 2012). Todas as amostras de RVC detectadas pelo NDE durante o período de estudo e aquelas previamente detectadas foram submetidas ao sequenciamento de nucleotídeos dos

segmentos correspondentes às proteínas VP4, VP6, VP7 e NSP4.

Para o sequenciamento dos RVA e RVC foi utilizado o produto, visível em gel de agarose, da 1ª ou 2ª amplificação de cada amostra, conforme os protocolos de amplificação anteriormente descritos.

3.7.1 Purificação do produto de PCR

O produto da PCR (1ª ou 2ª amplificação) foi submetido à purificação através do kit comercial *Pure-Link™ Purification kit* (Invitrogen, Carlsbad, CA) de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante. Foi adicionado 400µL do tampão de ligação acrescido de isopropanol (Merck & Co., Inc, Whitehouse Station, NJ) a cada produto da PCR amplificado submetido à sequenciamento, seguindo-se de homogeneização em agitador automático de tubos. As misturas foram transferidas para microtubos contendo a coluna de purificação, devidamente acoplados aos tubos coletores. As amostras foram centrifugadas em microcentrífuga (Eppendorf, modelo Centrifuge 5415 C) a 10 000 g à temperatura ambiente (20-25°C) por 1 minuto. Os filtrados coletados nos tubos coletores foram desprezados e os microtubos contendo a coluna de purificação foram transferidos para um novo tubo coletor. Adicionou-se 650µL de tampão de lavagem acrescido de etanol (Merck & Co., Inc, Whitehouse Station, NJ) a cada coluna, seguindo-se de centrifugação em microcentrífuga (Eppendorf, modelo Centrifuge 5415 C) a 10 000x g por 1 minuto à temperatura ambiente (20-25°C).

Os tubos coletores com o filtrado foram descartados e os microtubos contendo a coluna foram transferidos para o novo tubo coletor. Uma segunda centrifugação em microcentrífuga (Eppendorf, modelo Centrifuge 5415 C) a velocidade de 13 000 x g foi realizada por 2 a 3 minutos à temperatura ambiente (20-25°C) para remover qualquer resíduo do tampão de lavagem. Os microtubos contendo a coluna de purificação foram transferidos para o tubo de eluição e 50µL do tampão de eluição (10mM Tris/HCL, pH 8,5) foi adicionado a cada amostra. As misturas foram incubadas por 1 minuto à temperatura ambiente (20-25°C), seguindo-se de centrifugação em microcentrífuga (Eppendorf, modelo Centrifuge 5415 C) a velocidade de 13 000 x g por 2 minutos à temperatura ambiente (20-25°C). Os microtubos contendo a coluna de purificação

foram removidos e descartados. Após a purificação, a solução de cDNA obtida foi estocada a -20°C até o momento da reação de sequenciamento.

3.7.2 Quantificação do cDNA resultante da purificação do produto da PCR

A concentração do cDNA resultante do processo de purificação para cada amostra foi determinada através de comparação com o padrão de peso molecular *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen, Carlsbad, CA). As amostras purificadas foram submetidas à eletroforese em gel de agarose conforme descrito anteriormente nos itens 4.5.5 e 4.6.5 (Eletroforese em gel de agarose) e fotodocumentadas conforme itens 4.5.6 e 4.6.6 (Fotodocumentação do gel de agarose).

Os produtos foram analisados pela comparação visual da intensidade das bandas da amostra com as bandas do padrão de peso molecular *Low DNA Mass Ladder*, as quais correspondem a uma quantidade definida de DNA medida em nanogramas (ng) e fornecida pelo fabricante. Dessa forma, foi possível definir a concentração de DNA de cada amostra a ser usado na reação de sequenciamento.

3.7.3 Reação de sequenciamento

O DNA purificado foi submetido à reação cíclica de sequenciamento usando o kit comercial *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* (Applied Biosystems, Inc., EUA) e utilizando os primers descritos nas Tabelas 3, 4 e 8, seguindo o método de Sanger et al (1977). Em microtubos foi realizada a mistura para sequenciamento contendo: 2µL de *BigDye®* (Applied Biosystems, Inc., EUA); 6µL de tampão 5x concentrado (Invitrogen, Carlsbad, CA); 1µL de primer 3,2mM e água MilliQ estéril. O preparo da mistura é realizado no gelo e deve completar volume final de 25µL após adição do produto obtido na amplificação.

Os microtubos foram levados ao termociclador (Perkin Elmer Cetus, modelo GeneAmp PCR System 9600), o qual foi programado para amplificação em 25 ciclos (96°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos, 64°C por 4 minutos).

3.7.4 Purificação e precipitação do produto da reação de sequenciamento

O produto de sequenciamento foi purificado utilizando colunas de centrifugação *Centri-Sep™ spin columns* (Invitrogen, Carlsbad, CA) de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante. As colunas de purificação foram previamente hidratadas com 800µL de água milliQ estéril por 30 minutos à temperatura ambiente (20-25°C). Após a hidratação, as colunas foram acopladas a tubos coletores e centrifugadas em microcentrífuga (Eppendorf, modelo Centrifuge 5415 C) a 3.000 rpm por 3 minutos à temperatura ambiente (20-25°C). Os tubos coletores foram removidos e as colunas foram transferidas para novos microtubos. Adicionou-se 20µL do produto de cada *cycle sequencing* nos microtubos contendo a coluna de purificação, seguindo-se de centrifugação em microcentrífuga (Eppendorf, modelo Centrifuge 5415 C) a 3.000 rpm por 3 minutos. O filtrado contendo o produto de sequenciamento foi seco por centrifugação em centrífuga à vácuo (Eppendorf, modelo Concentrator 5301) a 45°C por 2,5 horas. O produto precipitado foi armazenado em freezer -20°C até o momento de sequenciar.

Na etapa final os produtos marcados (*Dye*) e ressuspendidos em 10µL de formamida Hi-Di™ (Applied Biosystems, Inc., EUA) foram aplicados no analisador automático de DNA (sequenciador automático) modelo ABI Prism 3100 (Applied Biosystems, Inc., EUA) utilizando o polímero POP6 (Applied Biosystems, Inc., EUA).

3.7.5 Análise molecular das sequências

Os cromatogramas obtidos das sequências senso e anti-senso através da análise do sequenciador automático foram editados manualmente a fim de se obterem sequências consenso (*contigs*), usando o software *Sequencher™ 4.7* (Gene Codes Corporation, Michigan, EUA). Os arquivos foram salvos no formato FASTA. O site *National Center for Biotechnology Information* (NCBI-<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) usando *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST-<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) foi utilizado como ferramenta para a comparação das sequências consenso obtidas (grupo RVA, RVC e genótipos). Para as sequências de RVA, a ferramenta *RotaC^{2.0} automated*

genotyping tool for Group A rotaviruses, disponível no site <http://rotac.regatools.be>, também foi utilizada para confirmação dos genótipos (Maes et al., 2009).

As sequências consenso geradas por edição manual e um conjunto de sequências cognatas de RVA ou RVC de origem humana e animal disponíveis e retiradas da base de dados *GenBank*, foram alinhadas utilizando o programa *Clustal W* (Thompson et al 1994). Ajustes manuais foram feitos para melhorar o alinhamento utilizando o software *BioEdit* (Ibis Therapeutics, EUA), incluindo a adequação dos *frames* de tradução (1, 2 e 3).

O cálculo da matriz de identidade de nucleotídeos (distância genética) e de aminoácidos foi determinado utilizando os softwares *Megalign* (DNASTar, Inc., Madison, Wisconsin EUA) e *BioEdit* (Ibis Therapeutics, EUA). As árvores genealógicas de nucleotídeos foram construídas com base no modelo evolutivo *Kimura 2-parameter* e as árvores genealógicas de aminoácidos com base no modelo *Poisson correction*. Ambas as árvores genealógicas utilizaram o critério de algoritmo de distância *Neighbor-Joining* (NJ) determinado pelo software MEGA versão 4.0 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) (Tamura et al., 2007). O valor de *bootstrap* foi calculado com 1000 repetições.

3.7.6 Números de Acesso

As sequências parciais de nucleotídeos dos RVA foram depositados no *GenBank* sob os seguintes números de acesso: JQ693565; JN848803; JX566991 para o gene VP7 e JQ693566; JQ693567; JN848804 para o gene VP4.

As sequências parciais de nucleotídeos dos RVC foram depositados no *GenBank* sob os seguintes números de acesso: JQ437389; JQ513873-JQ513881; HM853819-HM853824 para o gene VP6; JX842684-JX842702 para o gene VP7; JX842703-JX842714 para o gene VP4 e JX857429-JX857442; JX863408 para o gene NSP4.

3.8 Biossegurança

As práticas, os equipamentos de segurança e as instalações do nível de biossegurança 2 são indicados para atividades com fezes humanas ou de animais potencialmente contaminadas por RV (MS, 2006).

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Rotavírus do grupo A

4.1.1 Triagem das amostras para rotavírus grupo A

RVA foi detectado em 1181 (19,1%) do total de 6196 amostras coletadas de crianças, adultos e idosos no Brasil durante o período de 5 anos (Junho de 2007 a Junho de 2012) pela técnica de triagem EIA. A infecção por RVA foi detectada principalmente nos meses mais frios e secos, atingindo o máximo em Setembro (Figura 16). A taxa de detecção de RVA variou conforme o ano: 23,2% (173/746) em 2007; 25,9% (247/954) em 2008; 2,3% (20/877) em 2009; 29,8% (544/1824) em 2010; 15,8% (176/1111) em 2011 e 3,1% (21/684) em 2012. A DDA causada por RVA acometeu, principalmente, a faixa etária dos 6-18 anos (40,6%) (Tabela 9).

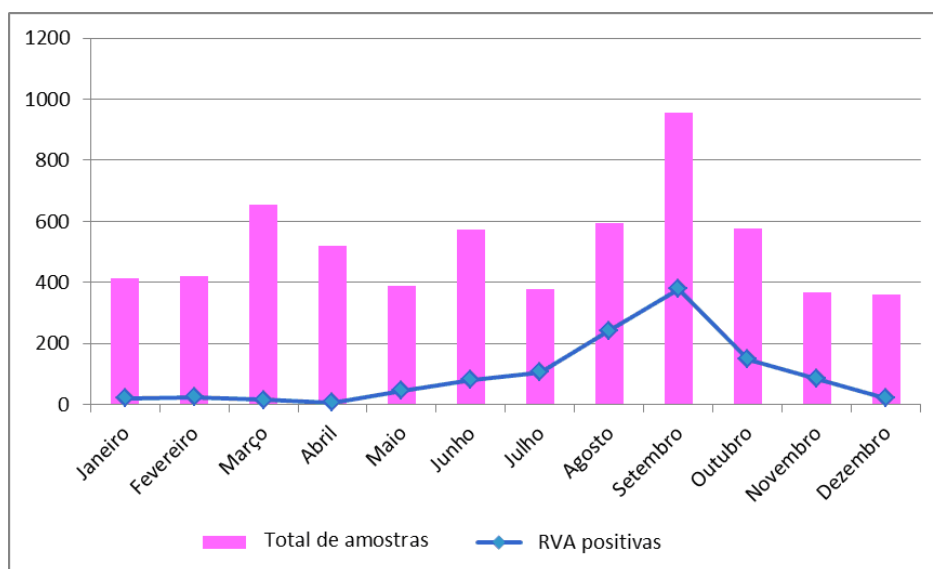


Figura 16. Distribuição sazonal da positividade de detecção de RVA em amostras coletadas de crianças, adultos e idosos nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil durante a vigilância nacional dos RV no período compreendido entre Junho de 2007 a Junho de 2012.

Tabela 9. Distribuição das amostras positivas para RVA de acordo com a faixa etária nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil durante a vigilância nacional dos RV no período compreendido entre Junho de 2007 e Junho de 2012.

Faixa etária (anos)	Número de amostras positivas	Total de amostras	Porcentagem (%)
≤5	821	4213	19,5%
6-18	215	529	40,6 %
19-59	99	1004	9,7%
≥60	15	202	7,4%
*	31	248	12,5%
Total	1181	6196	19,1%

*Idade do paciente não informada

4.1.2 Análise do perfil eletroforético das amostras positivas para rotavírus grupo A

Um total de 6196 amostras também foi testado por EGPA. Do total de 1181 amostras positivas para RVA detectadas por EIA, 982 (83,1%) foi confirmado como positivas por EGPA, sendo 25,2% (248/982) caracterizadas como perfil eletroforético “longo” e 65,5% (643/982) “curto”. Em 9,3% (91/982) das amostras não foi possível identificar o perfil.

4.1.3 Diversidade genotípica G e P das amostras positivas para rotavírus grupo A

No total, 1289 amostras (1056 positivas pra RVA e 233 amostras negativas) foram analisadas pela técnica de *semi-nested multiplex* RT-PCR, utilizando *pool* de primers específicos para a caracterização molecular da VP7 e VP4 e determinação dos respectivos genótipos G e P.

4.1.3.1 Genótipos G

A distribuição dos genótipos G de RVA no Brasil durante os 5 anos de estudo mostra que o genótipo G2 foi predominante (58,3%; 615/1056), seguido por G9 (10,2%;

108/1056), G3 (9,7%; 103/1056), G1 (5,9%; 62/1056), infecções mistas (5,3%; 55/1056), G12 (4,9%; 52/1056), não tipados (4,7%; 50/1056), G8 (0,9%; 10/1056) e G10 (0,1%; 1/1056) (Tabela10).

Houve um domínio do genótipo G2 entre os anos de 2007 e 2010 (65,1% em 2007; 88,0% em 2008; 33,3% em 2009 e 62,1% em 2010). Em 2011, observa-se uma alta frequência de detecção de G9 (41,0%; 68/166) e a emergência de G12 (61,6%; 16/26) em 2012. O genótipo raro G8 foi detectado entre os anos de 2009 e 2011 (0,9%; 10/1056) (Tabela 10).

Considerando os genótipos mais comumente encontrados infectando humanos, a frequência de detecção de G1 (5,9%; 62/1056) foi baixa e intermitente durante o período analisado, enquanto G4 não foi detectado. Em 2010, observa-se elevada frequência na detecção de infecções mistas apresentando combinações variadas (G1+G2, G1+G9, G1+G2+G3, G2+G3, G2+G9 e G2+G3+G9), atingindo um total de 8,9% (48/541). Infecções mistas também foram detectadas em 2007 (0,8%; 1/123), 2011 (2,4%; 4/166) e 2012 (7,7%; 2/26), entretanto apresentaram menor variabilidade quando comparadas a 2010 (Tabela 10).

Tabela 10. Distribuição dos genótipos G identificados nas amostras positivas para RVA coletadas nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil durante a vigilância nacional dos RV no período compreendido entre Junho de 2007 e Junho de 2012.

Genótipos	Ano						Total
	2007	2008	2009	2010	2011	2012	
G1	19,5% (24)	3,3% (6)	-	5,9% (32)	-	-	5,9% (62)
G2	65,1% (80)	88,0% (160)	33,3% (6)	62,1 (336)	19,3% (32)	3,8% (1)	58,3% (615)
G3	-	0,5% (1)	16,7% (3)	13,1% (71)	14,3% (24)	15,4% (4)	9,7% (103)
G8	-	-	27,7% (5)	0,7% (4)	0,6% (1)	-	0,9% (10)
G9	14,6% (18)	0,5% (1)	5,6% (1)	3,3% (18)	41,0% (68)	7,7% (2)	10,2% (108)
G10	-	-	-	-	-	3,8% (1)	0,1% (1)
G12	-	1,1% (2)	5,6% (1)	-	20,0% (33)	61,6% (16)	4,9% (52)
G1+G2	-	-	-	3,3% (18)	-	-	1,7% (18)
G1+G9	-	-	-	1,1% (6)	-	-	0,6% (6)
G1+G2+G3	-	-	-	0,6% (3)	0,6% (1)	-	0,4% (4)
G2+G3	-	-	-	3,3% (18)	-	-	1,7% (18)
G2+G9	0,8% (1)	-	-	0,4% (2)	-	-	0,3% (3)
G2+G3+G9	-	-	-	0,2% (1)	-	-	0,1% (1)
G2+G12	-	-	-	-	0,6% (1)	7,7% (2)	0,3% (3)
G3+G12	-	-	-	-	1,2% (2)	-	0,2% (2)
GNT*	-	6,6% (12)	11,1% (2)	6,0% (32)	2,4% (4)	-	4,7% (50)
Amostras positivas	123	182	18	541	166	26	1056
Amostras negativas	50	104	8	29	30	12	233
Total de amostras	173	286	26	570	196	38	1289

NT* não tipada

4.1.3.2 Genótipos P

O genótipo P[4] foi predominante (63,9%; 674/1056), seguido por P[8] (25,2%; 266/1056), não tipados (7,2%; 76/1056), infecções mistas (1,7%; 19/1056), P[6] (1,6%; 17/1056), P[9] (0,3%; 3/1056) e P[3] (0,1%; 1/1056). Os genótipos dominantes variam conforme o ano: P[4] (61,8%; 76/123) em 2007, P[4] (79,7%; 145/182) em 2008, P[6]

(33,3%; 6/18) em 2009, P[4] (75,8%; 411/541) em 2010, P[8] (68,7%; 114/166) em 2011 e P[8] (65,5%; 17/26) em 2012. Infecções mistas foram detectadas em 2009 (P[4]+P[6] e P[6]+P[8]) e 2010 (P[4]+P[6] e P[4]+P[8]) (Tabela 11).

Tabela 11. Distribuição dos genótipos P identificados nas amostras positivas para RVA coletadas nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil durante a vigilância nacional dos RV no período compreendido entre Junho de 2007 e Junho de 2012.

Genótipos	Ano						Total
	2007	2008	2009	2010	2011	2012	
P[3]	-	-	-	-	0,6% (1)	-	0,1% (1)
P[4]	61,8% (76)	79,7% (145)	27,7% (5)	75,8% (411)	20,5% (34)	11,5% (3)	63,9% (674)
P[6]	0,8% (1)	-	33,3% (6)	0,9% (5)	3,0% (5)	-	1,6% (17)
P[8]	29,3% (36)	4,4% (8)	16,7% (3)	16,3% (88)	68,7% (114)	65,5% (17)	25,2% (266)
P[9]	-	-	5,6% (1)	-	0,6% (1)	3,8% (1)	0,3% (3)
P[4]+P[6]	-	-	11,1% (2)	1,2% (6)	-	-	0,7% (8)
P[4]+P[8]	1,6% (2)	-	-	1,5% (8)	-	-	0,9% (10)
P[6]+P[8]	-	-	5,6% (1)	-	-	-	0,1% (1)
P[NT]*	6,5% (8)	15,9% (29)	-	4,3% (23)	6,6% (11)	19,2% (5)	7,2% (76)
Amostras positivas	123	182	18	541	166	26	1056
Amostras negativas	50	104	8	29	30	12	233
Total de amostras	173	286	26	570	196	38	1289

NT* não tipadas

4.1.3.3 Associação de genótipos G e P

Associações de genótipos G e P foram determinadas em 89,5% (945/1056) do total de amostras genotipadas. Foram identificadas 37 associações diferentes entre G e P. As combinações G1P[8], G2P[4], G3P[8], e G9P[8], que configuram entre as 5 cepas mais comuns globalmente, foram identificadas e representaram 74,6% (788/1056) de todas as cepas de RVA genotipadas. Entretanto, a cepa comum G4P[8], não foi identificada durante o período de estudo. A distribuição genotípica do RVA também

mostrou um perfil diferente para cada ano. Os genótipos predominantes foram: G2P[4] (60,3%; 74/123) em 2007, G2P[4] (77,3%; 140/182) em 2008, G2P[4] e G8P[6] (27,8%; 5/28) em 2009, G2P[4] (60,2%; 325/541) em 2010, G9P[8] (39,8%; 66/166) em 2011 e G12P[8] (46,5%; 12/26) em 2012. Foram observadas infecções mistas em todo o período analisado, entretanto uma maior diversidade foi observada em 2010. Combinações não usuais de genótipos de RVA comumente encontrados em humanos também foram detectadas (i.e. G1P[4], G3P[4], G9P[4] e G12P[4]) (Tabela 12).

Tabela 12. Distribuição da combinação de genótipos G e P identificados nas amostras positivas para RVA coletadas nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil durante a vigilância nacional dos RV no período compreendido entre Junho de 2007 e Junho de 2012.

Genótipos	Ano						Total
	2007	2008	2009	2010	2011	2012	
G1P[4]	0,8% (1)	-	-	0,5% (3)	-	-	0,4% (4)
G1P[8]	17,9% (22)	2,7% (5)	-	4,2% (23)	-	-	4,7% (50)
G1P[NT]	0,8% (1)	0,5% (1)	-	0,9% (5)	-	-	0,7% (7)
G1P[4]+P[8]	-	-	-	0,2% (1)	-	-	0,1% (1)
G1+G2P[4]	-	-	-	3,3% (18)	-	-	1,7% (18)
G1+G9P[8]	-	-	-	0,5% (3)	-	-	0,3% (3)
G1+G9P[NT]	-	-	-	0,4% (2)	-	-	0,2% (2)
G1+G9P[4]+P[8]	-	-	-	0,2% (1)	-	-	0,1% (1)
G1+G2+G3P[4]	-	-	-	0,5% (3)	-	-	0,3% (3)
G1+G2+G3P[NT]	-	-	-	-	0,6% (1)	-	0,1% (1)
G2P[4]	60,3% (74)	77,3% (140)	27,8% (5)	60,2% (325)	17,5% (29)	3,8% (1)	54,0% (574)
G2P[6]	0,8% (1)	-	-	-	-	-	0,1% (1)
G2P[NT]	3,2% (4)	11,0% (20)	-	0,9% (5)	1,8% (3)	-	3,0% (32)
G2P[4]+P[6]	-	-	5,6% (1)	0,4% (2)	-	-	0,3% (3)
G2P[4]+P[8]	0,8% (1)	-	-	0,7% (4)	-	-	0,5% (5)
G2+G3P[4]	-	-	-	2,0% (11)	-	-	1,0% (11)
G2+G3P[8]	-	-	-	0,4% (2)	-	-	0,2% (2)
G2+G3P[4]+P[6]	-	-	-	0,5% (3)	-	-	0,3% (3)
G2+G3P[4]+P[8]	-	-	-	0,4% (2)	-	-	0,2% (2)
G2+G3+G9P[8]	-	-	-	0,2% (1)	-	-	0,1% (1)
G2+G9P[4]	0,8% (1)	-	-	-	-	-	0,1% (1)
G2+G9P[8]	-	-	-	0,4% (2)	-	-	0,2% (2)
G2+G12P[4]	-	-	-	-	-	3,8% (1)	0,1% (1)
G2+G12P[8]	-	-	-	-	0,6% (1)	-	0,1% (1)
G2+G12P[NT]	-	-	-	-	-	3,8% (1)	0,1% (1)
G3P[3]	-	-	-	-	0,6% (1)	-	0,1% (1)
G3P[4]	-	-	-	4,1% (22)	-	-	2,1% (22)
G3P[6]	-	-	-	0,4% (2)	2,4% (4)	-	0,6% (6)
G3P[8]	-	0,5% (1)	16,4% (3)	7,9% (43)	10,8% (18)	11,5% (3)	6,4% (68)
G3P[NT]	-	-	-	0,4% (2)	0,6% (1)	3,8% (1)	0,4% (4)
G3P[4]+P[6]	-	-	-	0,2% (1)	-	-	0,1% (1)
G3P[4]+P[8]	-	-	-	0,2% (1)	-	-	0,1% (1)
G3+G12P[NT]	-	-	-	-	1,2% (2)	-	0,2% (2)
G8P[4]	-	-	-	0,7% (4)	0,6% (1)	-	0,5% (5)
G8P[6]	-	-	27,8% (5)	-	-	-	0,5% (5)
G9P[4]	-	-	-	0,2% (1)	-	-	0,1% (1)

Continuação

Genótipos	Ano						Total
	2007	2008	2009	2010	2011	2012	
G9P[8]	11,4% (14)	0,5% (1)	-	2,4% (13)	39,8% (66)	7,7% (2)	9,1% (96)
G9P[NT]	2,4% (3)	-	-	0,4% (2)	1,2% (2)	-	0,7% (7)
G9P[4]+P[8]	0,8% (1)	-	-	-	-	-	0,1% (1)
G9P[6]+P[8]	-	-	5,6% (1)	-	-	-	0,1% (1)
G10[NT]	-	-	-	-	-	3,8% (1)	0,1% (1)
G12P[4]	-	-	-	-	-	3,8% (1)	0,1% (1)
G12P[6]	-	-	-	-	0,6% (1)	-	0,1% (1)
G12P[8]	-	0,5% (1)	-	-	18,1% (30)	46,5% (12)	4,1% (43)
G12P[9]	-	-	5,6% (1)	-	0,6% (1)	3,8% (1)	0,3% (3)
G12P[NT]	-	0,5% (1)	-	-	0,6% (1)	7,7% (2)	0,4% (4)
GNTP[4]	-	2,7% (5)	-	4,2% (23)	2,4% (4)	-	3,0% (32)
GNTP[6]	-	-	5,6% (1)	0,2% (1)	-	-	0,2% (2)
GNTP[4]+P[6]	-	-	5,6% (1)	-	-	-	0,1% (1)
GNTP[NT]	-	3,8% (7)	-	1,5% (8)	-	-	1,4% (15)
Amostras positivas	123	182	18	541	166	26	1056
Amostras negativas	50	104	8	29	30	12	233
Total de amostras	173	286	26	570	196	38	1289

NT* não tipadas

4.1.3.4 Detecção de genótipos G e P atípicos

A caracterização molecular das amostras positivas permitiu a identificação de genótipos e/ou combinações de G e P atípicos, usualmente detectados em RVA de origem animal. São eles: G8P[6] detectado em 2009, G3P[3] detectado em 2011 e G10P[?] detectado em 2012 (Tabela 12).

4.1.4 Descrição e identificação das amostras positivas para rotavírus grupo A com genótipos e/ou combinações atípicas com suposta origem animal

As amostras de RVA apresentando a combinação atípica G8P[6] (cepa IAL-RN376 e IAL-RN377) foram detectadas em amostras fecais provenientes de comunidades indígenas, coletadas de crianças ≤3 anos de idade apresentando

sintomas de gastroenterite aguda. Foram detectadas 5 amostras G8P[6] em 2009 (Tabela 13).

Tabela 13. Dados sócios demográficos e moleculares dos pacientes positivos para RVA que apresentavam combinações atípicas G e P detectados durante a vigilância nacional dos RV no período compreendido entre Junho de 2007 e Junho de 2012.

Idade (Meses)	Sexo	Município	Estado	Ano	Perfil eletroforético	Genótipo	Cepa
12	M	Dourados (Aldeia Amambay)	MS	2009	Negativo	G8P[6]	-----
2	F	Dourados (Aldeia Bororó)	MS	2009	Curto	G8P[6]	-----
5	M	Dourados (Aldeia Bororó)	MS	2009	Curto	G8P[6]	-----
6	M	Dourados (Aldeia Bororó)	MS	2009	Negativo	G8P[6]	IAL-RN376
3	F	Dourados (Aldeia Bororó)	MS	2009	Curto	G8P[6]	IAL-RN377
12	F	Guarulhos	SP	2011	Longo	G3P[3]	IAL-R2638
36	M	Presidente Prudente	SP	2012	Negativo	G10P[?]	IAL-R2803

Não houve qualquer caracterização das populações indígenas a respeito da sua distribuição antropológica, componentes ambientais, acesso aos serviços de saúde ou situação vacinal. Este estudo se concentrou apenas na caracterização molecular das cepas de RVA detectadas. As comunidades indígenas estão localizadas na cidade de Dourados que é um município brasileiro da região Centro-Oeste, localizado no Estado de Mato Grosso do Sul (MS) (<http://www.ibge.gov.br/home/>) (Figura 17).



Fonte: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Dourados>

Figura 17. Mapa representando a localização da cidade de Dourados no Brasil e no Estado de Mato Grosso do Sul.

A cidade de Dourados localiza-se na zona do planalto do Estado de MS, próximo a Serra de Maracaju e na bacia do Rio Paraná. Situa-se próximo à divisa com o Estado do Paraná e próximo da fronteira com o Paraguai. Dourados é um importante centro agropecuário, comercial, industrial e de serviços da região e possui a segunda maior arrecadação de ICMS do estado. O território do atual município de Dourados era habitado por povos indígenas das etnias Terena, Kaiowa e Guarani. No entanto, devido a dificuldade encontrada pelo Estado em realizar o processo de legalização das terras para esses povos foi criada uma única "reserva" para todo o contingente de famílias indígenas que viviam na região. Hoje, cerca de 12,500 índios das três etnias vivem na "Reserva Indígena de Dourados", localizada a apenas 5 quilômetros do centro da cidade, em um pedaço de terra ínfimo quando comparado ao que utilizavam antes de 1950 (<http://www.ibge.gov.br/home/>).

A amostra de RVA apresentando a combinação atípica G3P[3] (cepa IAL-R2638) foi detectada em Junho de 2011 a partir de fezes coletada de uma criança de 1 ano de idade, sexo feminino, apresentando sintomas de gastroenterite aguda, proveniente de uma creche localizada na cidade de Guarulhos (Tabela 13). Guarulhos é um município brasileiro da região sudeste localizado no Estado de São Paulo (SP), pertencente a região Metropolitana da cidade de São Paulo. É a segunda cidade mais populosa do Estado, a 13ª mais populosa do Brasil e a 52ª mais populosa do continente americano (<http://www.ibge.gov.br/home/>) (Figura 18).



Fonte: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Guarulhos>

Figura 18. Mapa representado a localização da cidade de Guarulhos no Brasil e no Estado de São Paulo.

A amostra de RVA apresentando o genótipo atípico G10P[?] (cepa IAL-R2803) foi detectada em Janeiro de 2012 a partir de fezes coletada de uma criança de 3 anos de idade, sexo masculino, apresentando sintomas de gastroenterite aguda, proveniente da cidade de Presidente Prudente (Tabela 13). Presidente Prudente é um município brasileiro da região sudeste localizado no interior do Estado de São Paulo (SP). Pertencente à mesorregião e microrregião de mesmo nome, localizada a oeste da capital do Estado, a uma distância de 558 km (<http://www.ibge.gov.br/home/>) (Figura 19).



Fonte: http://pt.wikipedia.org/wiki/Presidente_Prudente#Subdivis.C3.B5es

Figura 19. Mapa representado a localização da cidade de Presidente Prudente no Brasil e no Estado de São Paulo.

A região de Presidente Prudente se destaca pelo setor rural e sua economia tem base na agricultura, pecuária e atividades agroindustriais (<http://www.cidadespaulistas.com.br/prt/cnt/10-presprudente.htm>). Com rebanho um bovino entre os maiores do país, cerca de 2,2 milhões de cabeças, Presidente Prudente é sede da região considerada a maior exportadora de carne do Brasil (<http://www.portalprudente.com.br/prudente.htm>), além de ser considerada uma das maiores bacias leiteiras do país (<http://www.cidadespaulistas.com.br/prt/cnt/10-presprudente.htm>).

4.1.5 Sequenciamento genômico de cepas de rotavírus do grupo A com genótipo G8P[6]

Das 5 amostras G8P[6] genotipadas por *semi-nested multiplex* RT-PCR, 2 amostras (IAL-RN376 e IAL-RN377) foram analisadas por sequenciamento genético. As outras 3 amostras positivas não apresentaram quantidade suficiente de cDNA para que a reação de sequenciamento fosse realizada com sucesso. O sequenciamento completo do gene 9 que codifica para a proteína VP7 foi realizado apenas para a cepa IAL-RN376, recebendo a denominação Hu/G8/IAL-RN376/2009/BRA e depositada no *GenBank* sob número de acesso JQ693565. O sequenciamento parcial do gene 4 que codifica para a proteína VP4 foi realizado para a cepa IAL-RN376, recebendo a denominação Hu/P[6]/IAL-RN376/2009/BRA e depositada no *GenBank* sob número de acesso JQ693566 e para a cepa IAL-RN377, recebendo a denominação Hu/P[6]/IAL-RN377/2009/BRA e depositada no *GenBank* sob número de acesso JQ693567.

4.1.5.1 Genótipo G8

A sequência de nucleotídeo obtida para a cepa G8 IAL-RN376 foi de 915pb (nucleotídeos 73-988). Para as análises de identidade, comparação com as cepas protótipos e construção da árvore genealógica, todas as sequências apresentaram o tamanho final de 915pb, contendo as 6 regiões hipervariáveis A-F.

A cepa G8 IAL-RN376 apresentou maior identidade nucleotídica com as cepas humanas DRC86 (98,9%) e DRC88 (98,7%), ambas isoladas na República Democrática do Congo em 2003 (Figura 20). A análise comparativa da cepa IAL-RN376 com outras cepas de origem humana revelou um alto percentual de identidade nucleotídica com cepas humanas detectadas no Brasil (R291 - 95,8%; 5353 - 96,6%; 5857 - 96,6%; 5664- 96,7%), na Espanha (RV1122 - 97,7%) e no continente Africano (1473 - 96,8%; HMG035 - 95,6%; SA4948JHB - 96,8%; KY6950 - 96,6%; MW4103 - 96,9%; 1290 - 97,8%). Entretanto, apresentou um baixo percentual de similaridade quando comparada a cepas humanas detectadas na Oceania (84,6%), Ásia (84,2-87,2%), Europa (84,6-86,6%) e outros países africanos (85,2-87%) (Figura 20). A análise comparativa entre a cepa G8 IAL-RN376 e cepas de origem animal, revelou uma identidade de nucleotídeos de 98% com a cepa símia KY1646 e de 95,7% com a cepa bovina NGBGg8, ambas isoladas na África (Figura 20). O alto percentual de

identidade compartilhado entre a cepa IAL-RN376, cepas humanas e cepas animais aparece claramente na árvore genealógica do tipo *Neighbor-Joining* (NJ) da Figura 21.

A cepa G8 IAL-RN376 revelou um valor de identidade genética menor quando comparada com outras cepas de genótipo G8 detectadas em animais, incluindo cepas de origem bovina (82,6-86,3%). Quando a cepa G8 IAL-RN376 foi comparada com a cepa humana padrão 69M (RVA/Human-tc/IND/69M/1980/G8P4[10] - EF672560) a percentagem de identidade nucleotídica foi de 84,2%. Em relação à única cepa ambiental utilizada na análise (cepa UC25.96), a cepa IAL-RN376 exibiu um percentual de identidade nucleotídica de apenas 83,8% (Figura 20, Figura 21).

A análise comparativa da cepa bovina NGRBg8, revelou que ela apresenta uma identidade de nucleotídeos maior com cepas de origem humana (96,1-99,8%) e com uma cepa símia (KY1646 - 97,2%) do que com as demais cepas de origem bovina (82,2-86,5%). Inclusive, a cepa bovina NGRBg8 apresentou maior identidade genética com a cepa humana HMG035 (99,8%), isolada na Nigéria em 1999-2000 (Figura 20, Figura 21). A cepa bovina NGRBg8 também apresentou elevada identidade genética com outras cepas humanas brasileiras: R291 (96,1%), 5353 (96,9%), 5877 (96,9%) e 5664 (96,8%) (Figura 20).

A árvore filogenética (Figura 21) também permitiu identificar 6 linhagens distintas, chamadas nesse estudo de I a VI. A primeira linhagem (I) é composta unicamente pela cepa bovina Cody I801 isolada nos EUA. A segunda linhagem (II) é ocupada por cepas de origem animal, com exceção da cepa ambiental U25.96 identificada na Suíça. A terceira linhagem (III) consiste em 3 cepas humanas e uma única cepa bovina (678) proveniente da Escócia. A linhagem IV é composta por 2 cepas humanas (6746 e SI-885). A quinta linhagem (V) é formada por 4 cepas humanas e uma cepa bovina (A5) isolada na Tailândia. A linhagem VI é a mais complexa, sendo composta por 14 cepas humanas, incluindo a cepa IAL-RN376, detectada neste estudo, e as demais cepas humanas brasileiras (R291, 5664, 5353 e 5877). Ainda, a linhagem VI engloba a cepa símia KY1646 e a cepa bovina NGRBg8, ambas isoladas na África.

A sequência de aminoácidos deduzida a partir da cepa IAL-RN376 foi determinada e comparada com as cepas de RVA G8 protótipos (Figura 22). A análise

da sequência deduzida de aminoácidos entre a cepa IAL-RN376 e as demais cepas protótipos revelou um percentual de identidade variando de 93,4% a 99,6% (Figura 23). A cepa G8 IAL-RN376 apresentou maior identidade de aminoácidos em relação as cepas de RVA humanas DRC86 (99,6%) e DRC88 (99,3%), ambas isoladas na República Democrática do Congo em 2003, seguido pela cepa símia KY1646 (98,6%), isolada na África (Kênia) em 1999 (Figura 23). A cepa IAL-RN376 também apresentou elevada identidade de aminoácidos com a cepa de RVA de origem bovina NGRBg8 (97%). A cepa IAL-RN376 apresentou menor identidade de aminoácidos em relação as cepas humanas 6736 e SI-R885 (93,4%), a cepa de guanaco Chubut (93,4%) e a cepa bovina Cody I801 (93,4%) (Figura 23).

A proteína VP7 da cepa IAL-RN376 possui um possível sítio de glicosilação N (aminoácido asparagina – Asn) localizado no aminoácido 69, o qual tende a ser conservado para todas as cepas de RVA e, um segundo sítio de glicosilação N localizado no aminoácido 238 (Figura 22). As regiões antigênicas da VP7 de A-F corroboram a classificação da cepa IAL-RN376 como genótipo G8. Considerando-se todas as regiões hipervariáveis de A a F, a cepa IAL-RN376 apresentou-se completamente idêntica apenas às cepas de RVA humanas DRC86 e DRC88 (Figura 22). As regiões hipervariáveis B (entre aminoácidos 87 a 101), C (entre aminoácidos 120 a 130), E (entre aminoácidos 207 a 220) e F (entre aminoácidos 233 a 242) apresentaram-se bastante conservadas entre todas as cepas analisadas, ao contrário das regiões A (aminoácidos 39 a 50) e D (aminoácidos 143 a 152), as quais se mostraram menos conservadas (Figura 22).

O alinhamento da sequência de aminoácidos deduzida a partir do gene VP7 revelou substituições na cepa IAL-RN376 dentro da região variável C (aminoácidos 120 a 130) na posição 122^{T→V}, região D (aminoácidos 143 a 152) na posição 146^{A→T}, região E (aminoácidos 207 a 220) na posição 218^{V→I} e região F (aminoácidos 233 a 242) na posição 237^{I→V}. Fora das regiões hipervariáveis, a cepa IAL-RN376 apresentou substituições nas posições 26^{I→V}, 65^{T→M}, 116^{V→I}, 139^{I→V} e 186^{S→A} (Figura 22).

A árvore genealógica construída a partir da sequência deduzida de aminoácidos (Figura 24) permite observar que as relações genéticas entre a cepa IAL-RN376 e as demais cepas protótipos estão mantidas. Entretanto, a Figura 24 não permite identificar

as linhagens gênicas evidenciadas na árvore filogenética.

	IAL-RN376	Niigata9801	C75	1473	HMG035	RV1122	6736	SA4948JHB	KY6950	MW4103	MG8.01	U25.96	69M	DG8	SI-885	R291	AU109	1290	DRC86	DRC88	MP409	Rio Negro	PTRV	OVR762	BP1062	KY1646	5353	5877	5664	EGY2295	O Agent	KJ25-1	678	A5	Cody	NGRBg8	Chubut	
IAL-RN376		83,7%	84,0%	96,8%	95,6%	97,7%	85,2%	96,8%	96,6%	96,9%	84,6%	83,8%	84,2%	84,6%	84,6%	95,8%	87,2%	97,8%	98,9%	98,7%	86,8%	84,3%	85,0%	83,5%	86,6%	98,0%	96,6%	96,6%	96,7%	87,0%	83,4%	84,2%	83,7%	86,3%	82,6%	95,7%	83,6%	
Niigata9801			96,6%	82,9%	83,5%	82,0%	83,6%	83,0%	83,8%	83,5%	87,7%	96,3%	87,6%	88,5%	83,8%	83,1%	84,0%	83,4%	83,1%	83,0%	83,0%	96,5%	96,7%	94,5%	84,1%	83,2%	83,7%	83,7%	83,8%	82,9%	94,8%	97,9%	87,3%	83,2%	85,5%	83,6%	96,0%	
C75				83,7%	84,0%	82,4%	84,3%	83,6%	83,9%	83,8%	88,3%	97,0%	88,4%	88,9%	84,6%	83,5%	83,6%	83,7%	83,5%	83,4%	83,4%	98,3%	97,4%	95,3%	83,5%	83,6%	84,0%	84,0%	84,1%	83,2%	95,4%	97,1%	88,3%	83,8%	86,7%	84,1%	97,9%	
1473					96,2%	96,7%	85,4%	99,3%	97,4%	98,4%	84,0%	83,0%	83,9%	83,9%	84,8%	96,7%	87,1%	98,6%	97,9%	97,8%	86,0%	83,8%	84,4%	82,7%	86,4%	98,2%	97,2%	97,2%	97,1%	86,7%	83,0%	83,7%	83,0%	85,6%	82,3%	96,3%	83,0%	
HMG035						95,5%	85,4%	96,2%	96,8%	96,8%	84,3%	83,6%	84,1%	84,4%	84,8%	96,0%	87,1%	97,3%	96,7%	96,6%	87,1%	84,3%	85,0%	83,5%	86,3%	97,1%	96,8%	96,8%	96,7%	87,9%	83,1%	84,0%	83,9%	86,4%	82,0%	99,8%	83,4%	
RV1122							84,8%	96,7%	96,5%	96,8%	83,0%	82,2%	82,8%	83,2%	84,1%	95,7%	86,5%	97,7%	98,5%	98,4%	85,4%	82,7%	83,4%	81,8%	85,9%	97,7%	96,5%	96,5%	96,3%	86,0%	82,2%	82,8%	82,2%	85,1%	81,3%	95,6%	81,9%	
6736								85,4%	85,6%	85,6%	83,8%	84,0%	84,0%	83,9%	99,3%	85,2%	84,8%	85,8%	85,5%	85,6%	83,6%	84,0%	83,8%	84,2%	84,4%	85,9%	85,9%	85,9%	85,8%	86,0%	83,2%	84,0%	84,0%	84,0%	84,2%	85,5%	83,6%	
SA4948JHB									97,2%	98,2%	84,3%	83,1%	84,3%	84,2%	84,8%	96,5%	87,3%	98,4%	97,7%	97,5%	86,4%	83,9%	84,6%	82,8%	86,7%	98,0%	97,0%	97,0%	96,9%	86,7%	83,4%	83,8%	83,4%	85,9%	82,6%	96,3%	83,1%	
KY6950										97,4%	84,7%	83,5%	84,1%	84,6%	85,0%	98,7%	87,4%	98,3%	97,7%	97,5%	87,0%	84,2%	84,7%	83,1%	86,8%	98,1%	99,3%	99,3%	99,2%	87,4%	83,5%	84,3%	83,5%	86,7%	82,8%	96,9%	83,5%	
MW4103											84,4%	83,4%	84,2%	84,4%	85,2%	96,7%	87,7%	98,9%	98,0%	97,9%	86,4%	84,1%	84,8%	83,2%	86,8%	98,4%	97,4%	97,4%	97,3%	87,2%	83,4%	84,0%	83,6%	86,1%	82,5%	96,9%	83,1%	
MG8.01												88,2%	92,6%	94,9%	83,8%	84,7%	85,5%	84,6%	83,9%	83,8%	85,1%	88,5%	88,3%	87,9%	85,5%	84,4%	84,9%	84,9%	85,0%	84,9%	88,6%	88,2%	92,7%	84,9%	85,2%	84,4%	87,6%	
U25.96													88,1%	88,3%	84,2%	83,0%	83,2%	83,2%	83,2%	83,2%	83,1%	83,6%	97,0%	97,0%	94,6%	83,1%	83,1%	83,6%	83,6%	83,7%	83,1%	94,5%	96,9%	87,7%	83,5%	86,0%	83,7%	96,6%
69M														93,1%	84,0%	83,7%	85,2%	84,1%	83,5%	83,4%	84,3%	88,5%	88,9%	88,2%	85,1%	84,0%	84,2%	84,3%	83,8%	88,1%	88,5%	94,1%	84,7%	85,1%	84,2%	87,5%		
DG8															84,1%	84,6%	86,1%	84,6%	83,9%	83,8%	84,6%	88,8%	89,0%	87,8%	85,9%	84,4%	84,9%	84,9%	85,0%	85,3%	89,5%	88,8%	93,2%	84,9%	86,1%	84,6%	87,8%	
SI-885																	84,6%	85,0%	85,3%	84,9%	85,0%	83,6%	84,2%	84,0%	84,2%	84,7%	85,2%	85,2%	85,1%	86,0%	83,5%	84,2%	84,0%	83,8%	84,2%	84,9%	83,8%	
R291																		87,1%	97,5%	96,9%	96,8%	87,0%	83,8%	84,2%	82,7%	86,4%	97,3%	99,0%	99,0%	98,9%	86,7%	83,5%	83,7%	83,5%	86,3%	82,4%	96,1%	83,0%
AU109																			87,7%	87,1%	87,2%	88,4%	83,7%	84,4%	83,8%	96,8%	87,4%	87,4%	87,5%	89,7%	83,9%	83,7%	85,3%	83,0%	89,6%	87,2%	82,9%	
1290																																						
DRC86																																						
DRC88																																						
MP409																																						
Rio Negro																																						
PTRV																																						
OVR762																																						
BP1062																																						
KY1646																																						
5353																																						
5877																																						
5664																																						
EGY2295																																						
O Agent																																						
KJ25-1																																						
678																																						
A5																																						
Cody																																						
NGRBg8																																						
Chubut																																						



Figura 20. Matriz de identidade das seqüências nucleotídicas parciais do gene VP7 de RVA genótipo G8 gerada com o software *BioEdit* (Ibis Therapeutics, EUA). A cepa IAL-RN376 foi detectada em uma criança de 6 meses de idade apresentando gastroenterite aguda proveniente de uma comunidade indígena localizada na cidade de Dourados, Estado do Mato Grosso do Sul (MS), Brasil. Sequências G8 de referência foram obtidas a partir do *GenBank*.

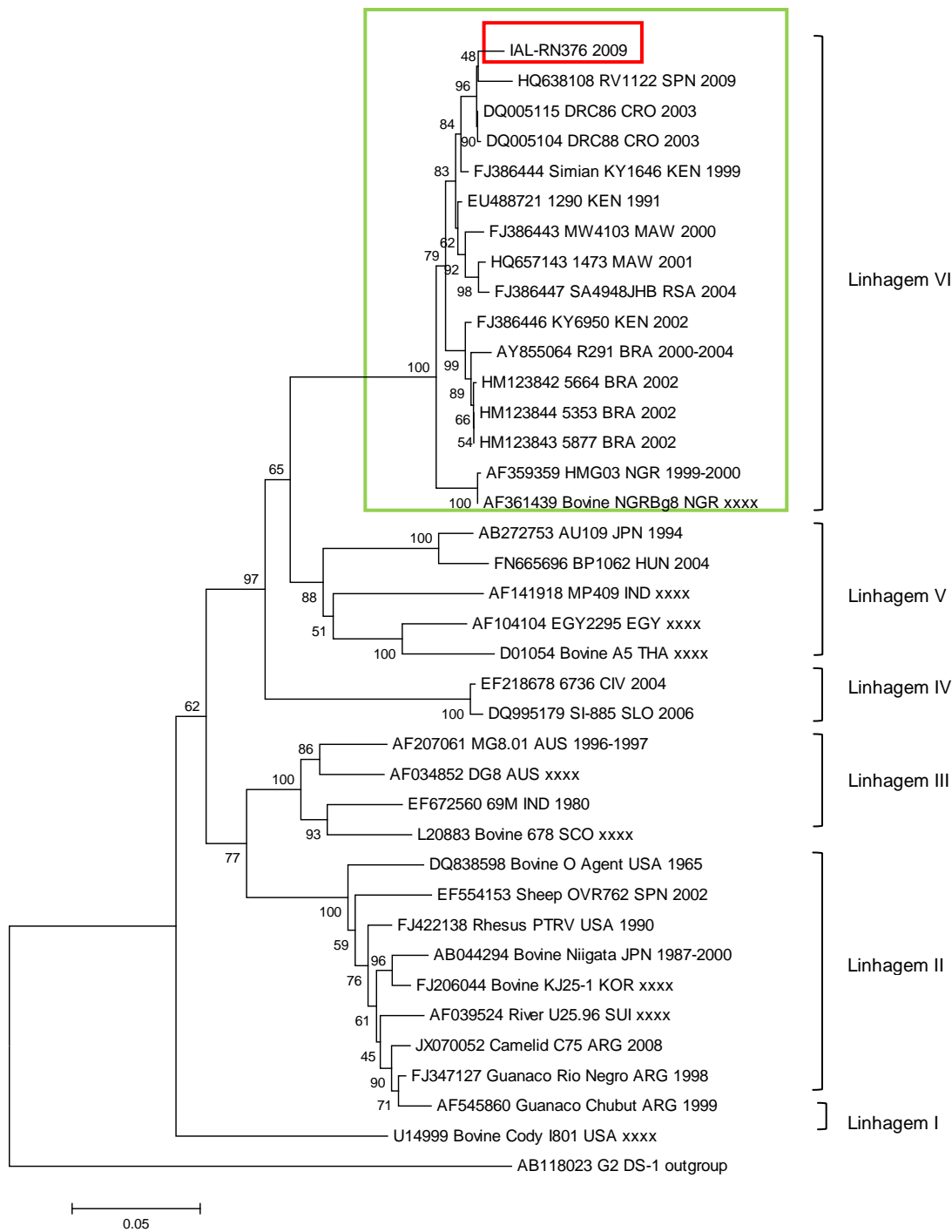


Figura 21. Árvore genealógica do tipo *Neighbor-Joining* (NJ) da sequência nucleotídica parcial gene VP7 de RVA genótipo G8 da cepa IAL-RN376 (retângulo vermelho) gerada com o software MEGA 4.0. A cepa IAL-RN376 foi detectada em uma criança de 6 meses de idade apresentando gastroenterite aguda proveniente de uma comunidade indígena localizada na cidade de Dourados, Estado do Mato Grosso do Sul (MS), Brasil. Sequências G8 de referência foram obtidas a partir do *GenBank*. O retângulo verde destaca as cepas de RVA com maior percentual de similaridade em relação à cepa IAL-RN376. Os números romanos de I a VI representam 6 linhagens geneticamente distintas. As espécies e os números de acesso de cada cepa estão indicados. As siglas dos países de cada cepa estão descritas no Anexo 1. A escala indica a diversidade genética. Percentuais dos valores de *bootstrap* estão localizados nos nós dos ramos.

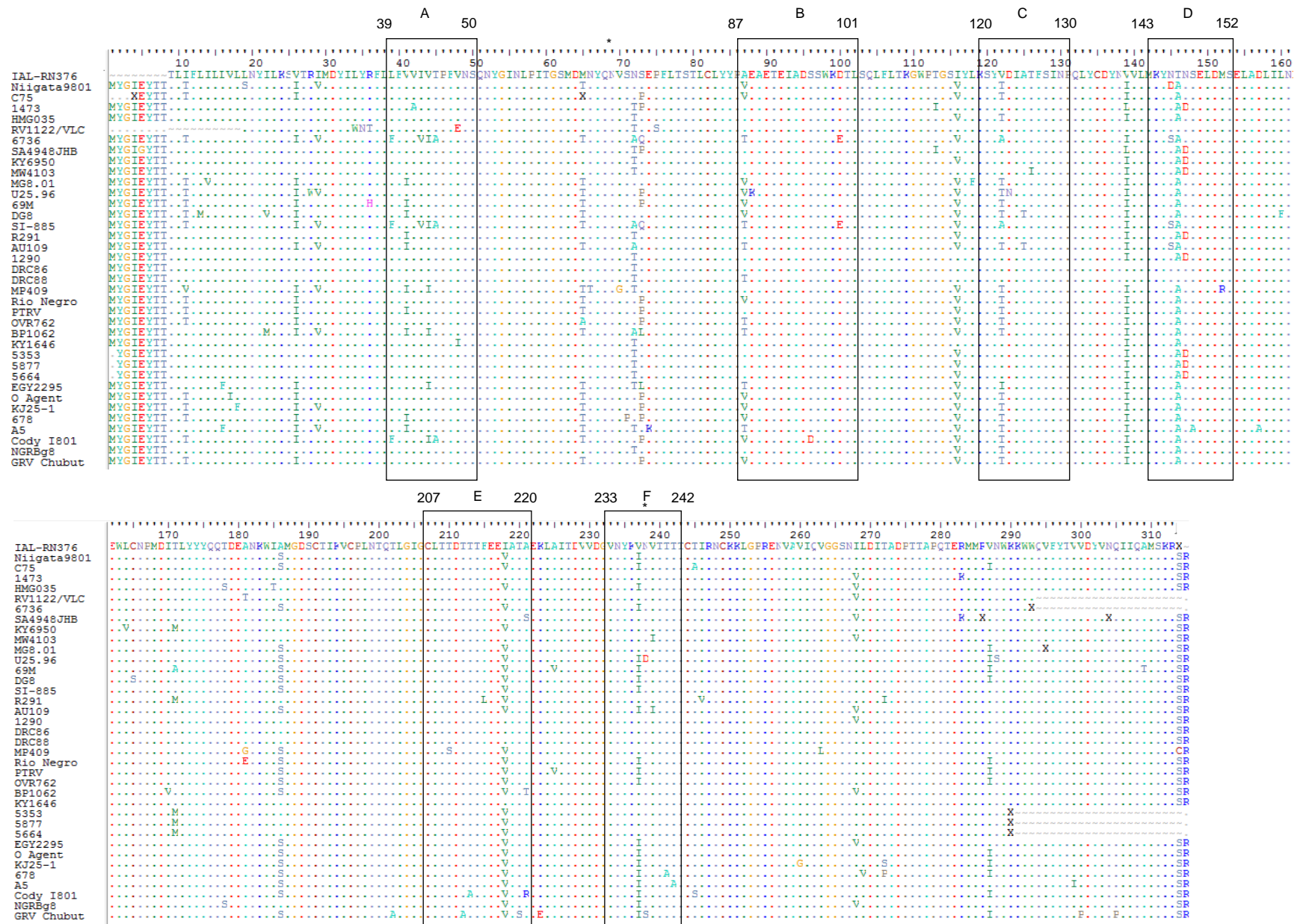


Figura 22. Alinhamento da sequência de aminoácidos deduzida a partir da sequência de nucleotídeos do gene VP7 entre a cepa G8 IAL-RN376 e as cepas protótipos. As regiões hipervariáveis A-F estão indicadas. Os sítios de glicosilação N (aminoácidos 69 e 238) estão indicados por asteriscos. As abreviações referentes aos aminoácidos estão listadas no Anexo 2.

	IAL-RN376	Niigata9801	C75	1473	HMG035	RV1122	6736	SA4948JHB	KY6950	MW4103	MG8.01	U25.96	69M	DG8	SI-885	R291	AU109	1290	DRC86	DRC88	MP409	Rio Negro	PTRV	OVR762	BP1062	KY1646	5353	5877	5664	EGY2295	O Agent	KJ25-1	678	A5	Cody	NGRBg8	Chubut	
IAL-RN376		95,4%	95,4%	97,0%	96,7%	97,3%	93,4%	97,0%	97,3%	97,7%	95,0%	93,7%	94,0%	94,0%	93,4%	96,3%	94,4%	98,3%	99,6%	99,3%	93,7%	95,4%	95,4%	95,7%	94,0%	98,6%	97,3%	97,3%	97,3%	95,0%	95,4%	94,4%	94,0%	93,7%	93,4%	93,4%	97,0%	93,4%
Niigata9801			97,7%	93,4%	96,0%	92,7%	96,3%	93,4%	95,4%	94,4%	97,0%	97,0%	96,7%	96,7%	96,3%	94,4%	97,0%	95,0%	95,0%	95,0%	95,4%	98,0%	97,3%	97,7%	95,7%	95,4%	95,4%	95,4%	95,4%	96,3%	98,0%	97,7%	96,7%	96,0%	96,0%	96,3%	96,3%	96,0%
C75				94,0%	96,0%	92,7%	95,4%	94,0%	95,4%	94,4%	97,3%	97,3%	97,7%	97,0%	95,4%	94,4%	95,7%	95,0%	95,0%	95,0%	94,4%	99,0%	98,3%	99,0%	95,0%	95,4%	95,4%	95,4%	95,4%	96,3%	99,0%	98,0%	97,7%	95,0%	97,3%	96,3%	97,0%	
1473					96,0%	95,7%	92,1%	99,3%	96,7%	97,7%	93,1%	92,4%	92,7%	92,1%	92,1%	95,7%	93,4%	98,3%	97,3%	97,0%	92,4%	94,0%	94,0%	94,4%	93,4%	97,3%	96,7%	96,7%	94,7%	94,0%	93,1%	92,7%	92,4%	92,1%	96,3%	92,1%	92,1%	
HMG035						95,4%	94,0%	96,0%	97,3%	97,0%	95,0%	94,4%	94,7%	94,7%	94,0%	96,3%	96,0%	97,7%	97,0%	96,7%	94,4%	96,0%	96,0%	96,3%	95,0%	97,3%	97,3%	97,3%	97,3%	96,7%	96,0%	95,0%	94,7%	95,0%	94,0%	99,6%	94,0%	
RV1122							91,1%	95,7%	95,4%	96,3%	92,4%	91,1%	91,8%	91,4%	91,1%	94,4%	92,7%	97,0%	97,7%	97,3%	92,1%	93,1%	92,7%	93,1%	92,4%	97,0%	95,4%	95,4%	95,4%	93,7%	92,7%	91,8%	91,4%	91,8%	90,8%	95,7%	90,8%	
6736								92,1%	93,7%	92,7%	94,4%	94,7%	94,4%	94,0%	100,0%	92,7%	96,0%	93,4%	93,4%	93,7%	94,0%	95,7%	95,4%	96,0%	95,4%	93,7%	93,7%	93,7%	93,7%	96,0%	95,7%	95,4%	94,4%	94,4%	95,7%	94,4%	93,7%	
SA4948JHB									96,7%	97,7%	93,1%	92,4%	92,7%	92,1%	92,1%	95,7%	93,4%	98,3%	97,3%	97,0%	92,4%	94,0%	94,0%	94,4%	93,7%	97,3%	96,7%	96,7%	94,7%	94,0%	93,1%	92,7%	92,4%	92,4%	96,3%	92,1%		
KY6950										97,7%	95,0%	93,7%	94,4%	94,0%	93,7%	98,3%	94,7%	98,3%	97,7%	97,3%	94,4%	95,4%	95,4%	95,7%	94,4%	98,0%	99,3%	99,3%	99,3%	95,7%	95,4%	94,4%	94,0%	94,4%	93,4%	97,7%	93,4%	
MW4103											94,0%	92,7%	93,1%	93,1%	92,7%	96,7%	95,0%	99,3%	98,0%	97,7%	93,4%	94,4%	94,4%	94,7%	94,0%	98,3%	97,7%	97,7%	97,7%	95,4%	94,4%	93,4%	93,1%	93,4%	92,4%	97,3%	92,4%	
MG8.01												96,0%	97,0%	97,0%	94,4%	94,7%	95,7%	94,7%	94,7%	94,7%	95,0%	97,7%	97,7%	97,3%	95,4%	95,0%	95,0%	95,0%	95,4%	97,7%	96,7%	97,0%	95,0%	95,7%	95,4%	95,4%		
U25.96														96,3%	95,7%	94,7%	92,7%	95,0%	93,4%	93,4%	93,4%	93,7%	97,7%	97,0%	97,3%	94,4%	93,7%	93,7%	93,7%	95,0%	97,7%	97,3%	96,3%	94,4%	95,7%	94,7%		
69M															96,7%	94,4%	94,0%	95,4%	93,7%	93,7%	94,0%	98,0%	98,6%	97,7%	94,7%	94,0%	94,4%	94,4%	94,4%	95,4%	98,0%	97,0%	97,3%	94,7%	96,0%	95,0%		
DG8																																						
SI-885																																						
R291																																						
AU109																																						
1290																																						
DRC86																																						
DRC88																																						
MP409																																						
Rio Negro																																						
PTRV																																						
OVR762																																						
BP1062																																						
KY1646																																						
5353																																						
5877																																						
5664																																						
EGY2295																																						
O Agent																																						
KJ25-1																																						
678																																						
A5																																						
Cody																																						
NGRBg8																																						
Chubut																																						



Figura 23. Matriz de identidade das sequências deduzidas de aminoácidos a partir das sequências nucleotídicas parciais do gene VP7 de RVA genótipo G8 gerada com o software *BioEdit* (Ibis Therapeutics, EUA). A cepa IAL-RN376 foi detectada em uma criança de 6 meses de idade apresentando gastroenterite aguda proveniente de uma comunidade indígena localizada na cidade de Dourados, Estado do Mato Grosso do Sul (MS), Brasil. Sequências G8 de referência foram obtidas a partir do *GenBank*.

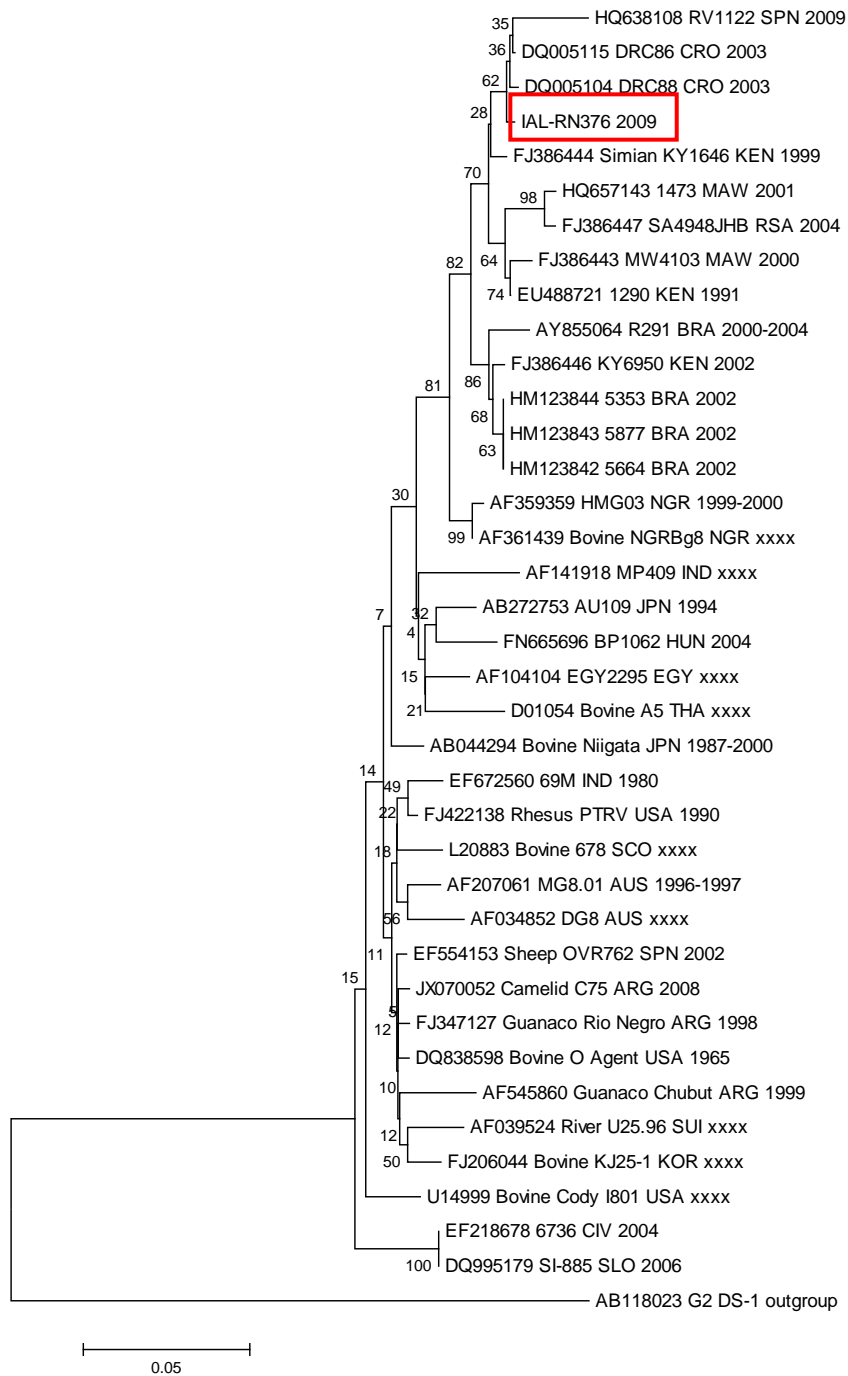


Figura 24. Árvore genealógica do tipo *Neighbor-Joining* (NJ) da sequência aminoácidos deduzida a partir da sequência nucleotídica parcial do gene VP7 de RVA genótipo G8 da cepa IAL-RN376 (retângulo vermelho) gerada com o software MEGA 4.0. A cepa IAL-RN376 foi detectada em uma criança de 6 meses de idade apresentando gastroenterite aguda proveniente de uma comunidade indígena localizada na cidade de Dourados, Estado do Mato Grosso do Sul (MS), Brasil. Sequências G8 de referência foram obtidas a partir do *GenBank*. As espécies e os números de acesso de cada cepa estão indicados. As siglas dos países de cada cepa estão descritas no Anexo 1. A escala indica a diversidade proteica. Percentuais dos valores de *bootstrap* estão localizados nos nós dos ramos.

4.1.5.2 Genótipo P[6]

Os produtos das sequências de nucleotídeos obtidas para as cepas P[6] IAL-RN376 e IAL-RN377 foram de 781pb (nucleotídeos 57-838) e 778pb (nucleotídeos 60-838), respectivamente. Para as análises de identidade, comparação com as cepas protótipos e construção da árvore genealógica, foram utilizadas sequências com 778pb, contendo a região hipervariável que compreende os aminoácidos 71-204.

As cepas P[6] IAL-RN376 e IAL-RN377 apresentaram maior identidade nucleotídica com a cepa humana R330 isolada na Irlanda (99,6% e 99,4%, respectivamente) e 99,8% de identidade nucleotídica quando comparadas entre si (Figura 25). A análise genética das sequências parciais do gene VP4 permitiu observar que as cepas humanas brasileiras HST369 e HST435 isoladas em Belém do Pará (PA) em 1999 e 2000, respectivamente, e a cepa humana sul coreana KMR720 detectada em 2000-2001, exibem alta similaridade nucleotídica (97,6%) com a cepa de RVA P[6] africana KE4852/07 detectada em morcego da fruta (*straw-colored fruit bat; Eidolon helvum*) no Quênia em 2007 (Figura 25).

O alto percentual de identidade compartilhado entre a cepa de quiróptero KE4852/07 e as cepas humanas fica mais evidente na Figura 26. A análise comparativa entre as cepas P[6] IAL-RN376 e IAL-RN377 detectadas nesse estudo e a cepa de quiróptero KE4852/07, revelou uma identidade de nucleotídeos de 94,7% e 94,6%, respectivamente. Quando as cepas IAL-RN376 e IAL-RN377 foram comparadas com as cepas humanas brasileiras HST435 e HST369 observou-se um percentual de similaridade genética de 96,5% e 96,4%, respectivamente (Figura 25, Figura 26).

A cepa padrão porcina Gottfried (M33516) exibiu uma identidade de nucleotídeos de 80% para as cepas IAL-RN376 e IAL-RN377, e de 80,9% para as cepas humanas HST435 e HST369. As demais cepas porcinas exibem identidade de nucleotídeos variando de 81,8% a 87,9% quando comparadas com as cepas humanas IAL-RN376 e IAL-RN377. A identidade de nucleotídeos encontrada em relação à cepa padrão humana ST3 (L33895) foi de 94,2% e 94,1% para as cepas IAL-RN376 e IAL-RN377, respectivamente, e de 95,1% para as cepas HST435 e HST369 (Figura 25).

Quando as cepas IAL-RN376 e IAL-RN377 foram comparadas à outra cepa humana, também de origem brasileira (NB321) detectada em Belém do Pará (PA) em 1997, o percentual de identidade foi de 96,9% e 96,8%, respectivamente (Figura 25).

As sequências parciais das cepas humanas IAL-RN376, IAL-RN377, HST435 e HST369 também foram comparadas com a cepa BRA898/07-Po de origem suína detectada no Brasil em 2007. Essa comparação revelou que os percentuais de identidade nucleotídica variaram de 87,9% a 88,1%. Quando as cepas porcinas e a cepa de quiróptero (KE4852/07) foram comparadas entre si foi observada uma similaridade de 80,3-86,8%. A comparação das cepas IAL-RN376 e IAL-RN377 com a cepa africana DRC86 de origem humana, mostrou um percentual de identidade nucleotídica de 95,6% e 95,5%, respectivamente (Figura 25).

A árvore filogenética (Figura 26) permitiu identificar as 5 linhagens (I a V) descritas para o genótipo P[6]. A linhagem I é formada por cepas de RVA P[6] identificadas em humanos com exceção da cepa de quiróptero KE4852/07 isolada no Kênia em 2007. A linhagem II é composta unicamente pela cepa porcina Gottfried isolada no EUA em 1975. A linhagem III é composta exclusivamente pelas cepas porcinas JP3-6 e JP29-6 isoladas no Japão em 2000-2002. A linhagem IV é ocupada por cepas 3 humanas isoladas na Hungria. A linhagem V é formada por 3 cepas porcinas isoladas na Itália em 2004 e por uma cepa humana detectada na Hungria em 2000.

A sequência de aminoácidos deduzida a partir das cepas IAL-RN376 e IAL-RN377 foram determinadas e comparadas com cepas protótipos de RVA P[6] (Figura 27). A análise da sequência deduzida de aminoácidos entre as cepas IAL-RN376 e IAL-RN377 e as demais cepas protótipos revelou um percentual de identidade variando de 80,4% a 99,2% (Figura 28). As cepas P[6] IAL-RN376 e IAL-RN377 apresentaram maior identidade de aminoácidos com a cepa de RVA humana R330 (99,2% e 98,8%, respectivamente) e 99,6% de identidade entre si. As cepas IAL-RN376 e IAL-RN377 apresentaram menor identidade de aminoácidos em relação à cepa porcina Gottfried (80,8% e 80,4%, respectivamente). Em relação as demais cepas porcinas, as cepas IAL-RN376 e IAL-RN377, exibiram uma identidade de aminoácidos variando de 84,6% a 89,6% (Figura 28).

As cepas humanas brasileiras HST369 e HST435 e a cepa humana sul coreana KMR720, exibiram similaridade de aminoácidos de 96,1-96,5% com a cepa de morcego KE4852/07. Entretanto, a cepa de morcego KE4852/07 apresentou maior percentual de similaridade de aminoácidos em relação à cepa humana 6782 (97,3%) isolada em Camarões em 2000. A análise comparativa entre as cepas IAL-RN376 e IAL-RN377 detectadas nesse estudo e a cepa de quiróptero KE4852/07, revelou um percentual de identidade de 95,0% e 94,6%, respectivamente. Quando as cepas IAL-RN376 e IAL-RN377 foram comparadas com as cepas humanas brasileiras HST435 e HST369, observou-se um percentual de similaridade de aminoácidos de 97,7% e 97,3%, respectivamente (Figura 28).

A Figura 27 mostra a sequência de aminoácidos deduzida a partir da sequência de nucleotídeos do gene VP4 das cepas IAL-RN376 e IAL-RN377 e as sequências de aminoácidos de cepas protótipos do genótipo P[6]. As proteínas VP4 das cepas IAL-RN376 e IAL-RN377 apresentaram os sítios de clivagem pela tripsina conservados e localizados nos resíduos de arginina (R) 230, 240 e 246. O sítio de arginina da posição 230 foi substituído por uma lisina (K) nas cepas humanas XJ99-468 e BJ-CR4916, ambas detectadas na China. A cisteína (C) conservada na posição 215 e os resíduos de prolina (P) conservados nas posições 68, 71, 224 e 225 estão presentes nas cepas IAL-RN376 e IAL-RN377 (Figura 27).

O alinhamento da sequência de aminoácidos deduzida a partir do gene VP4 das cepas IAL-RN376 e IAL-RN377 revelaram que a região hipervariável da subunidade VP8* (entre os aminoácidos 71 e 204) está bastante conservada entre todas as cepas analisadas, corroborando a classificação das cepas IAL-RN376 e IAL-RN377 como genótipo P[6]. Uma evidente substituição de aminoácidos foi observada unicamente nas cepas IAL-RN376 e IAL-RN377, as quais substituíram treonina (T) por alanina (A) na posição 198. Ainda considerando a região hipervariável da subunidade VP8*, foi possível observar a substituição 135^{N→S} nas cepas IAL-RN376 e IAL-RN377, a qual é compartilhada pelas cepas humanas R330 (isolada na Irlanda em 2003-2006), BP1231/02 (isolada na Hungria em 2000) e KY6950 (isolada no Kênia em 2002), e também pelas cepas porcinas BRA898/07-Po (isolada no Brasil em 2007), 221/04-19, 221/04-20 e 221/04-21 (isoladas na Itália em 2004). Outra substituição na posição

146^{N→S} da região hipervariável também foi observada nas cepas IAL-RN376 e IAL-RN377 (Figura 27). Substituições de resíduos de aminoácidos nas cepas IAL-RN376 e IAL-RN377 foram observadas fora da região hipervariável: 30^{S→N} e 255^{I→V} (Figura 27).

Embora os percentuais de similaridade de nucleotídeos e aminoácidos obtidos variem quando as diversas cepas de RVA são comparadas entre si, a árvore genealógica construída a partir da sequência deduzida de aminoácidos (Figura 29) permite observar que as relações genéticas entre as cepas IAL-RN376 e IAL-RN377 e as demais cepas protótipos estão mantidas. A Figura 29 também evidencia as linhagens previamente descritas para o genótipo P[6] (I a V), da mesma forma que foram destacados na Figura 26.

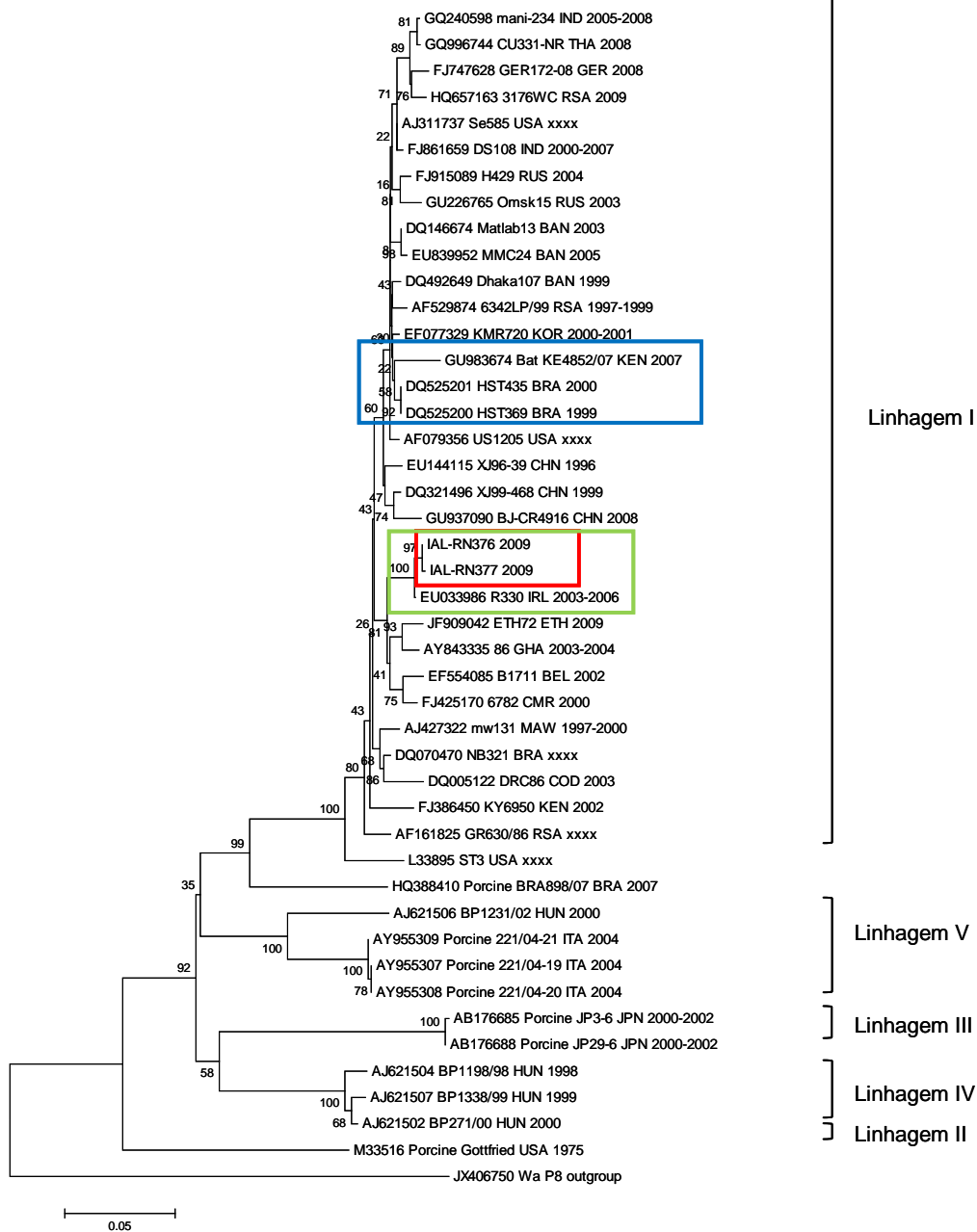


Figura 26. Árvore genealógica do tipo *Neighbor-Joining* (NJ) da sequência nucleotídica parcial do gene VP4 de RVA genótipo P[6] das cepas IAL-RN376 e IAL-RN377 (retângulo vermelho) gerada com o software MEGA 4.0. As cepas IAL-RN376 e IAL-RN377 foram detectadas em crianças de 6 e 3 meses de idade, respectivamente, apresentando gastroenterite aguda provenientes de comunidades indígenas localizadas na cidade de Dourados, Estado do Mato Grosso do Sul (MS), Brasil. Sequências P[6] de referência foram obtidas a partir do *GenBank*. O retângulo verde destaca as cepas de RVA com maior percentual de similaridade em relação às cepas IAL-RN376 e IAL-RN377. O retângulo azul destaca as cepas de RVA com maior percentual de similaridade em relação à cepa de morcego KE4852/07. Os números romanos de I a V representam 5 linhagens geneticamente distintas. As espécies e os números de acesso de cada cepa estão indicados. As siglas dos países de cada cepa estão descritas no Anexo 1. A escala indica a diversidade genética. Percentuais dos valores de *bootstrap* estão localizados nos nós dos ramos.

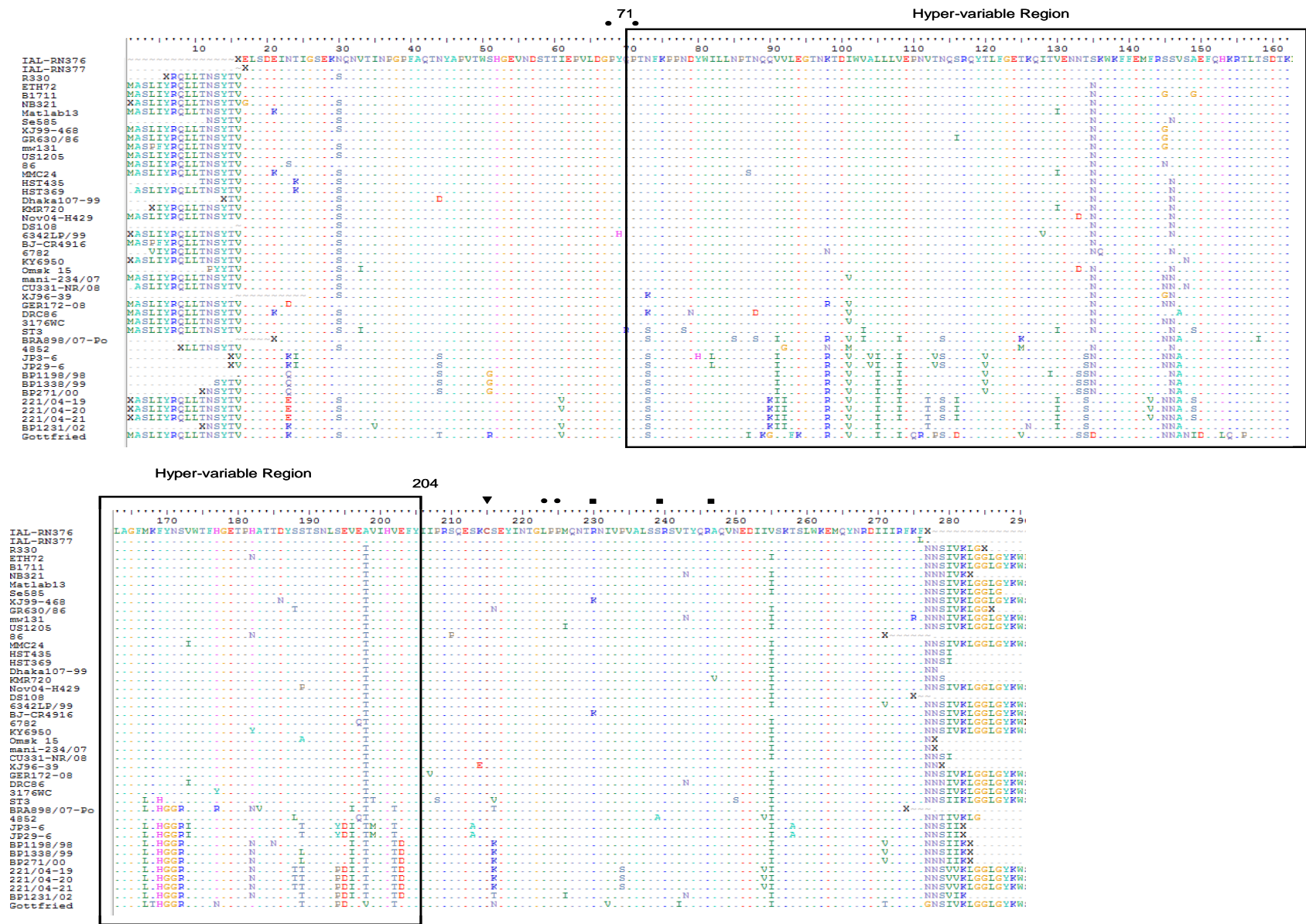


Figura 27. Alinhamento da sequência de aminoácidos deduzida a partir da sequência de nucleotídeos do gene VP4 entre as cepas P[6] IAL-RN376 e IAL-RN377 e as cepas protótipos. Os resíduos conservados de cisteínas (▼), prolínas (●), argininas (■) e a região hipervariável estão indicados. As abreviações referentes aos aminoácidos estão listadas no Anexo 2.

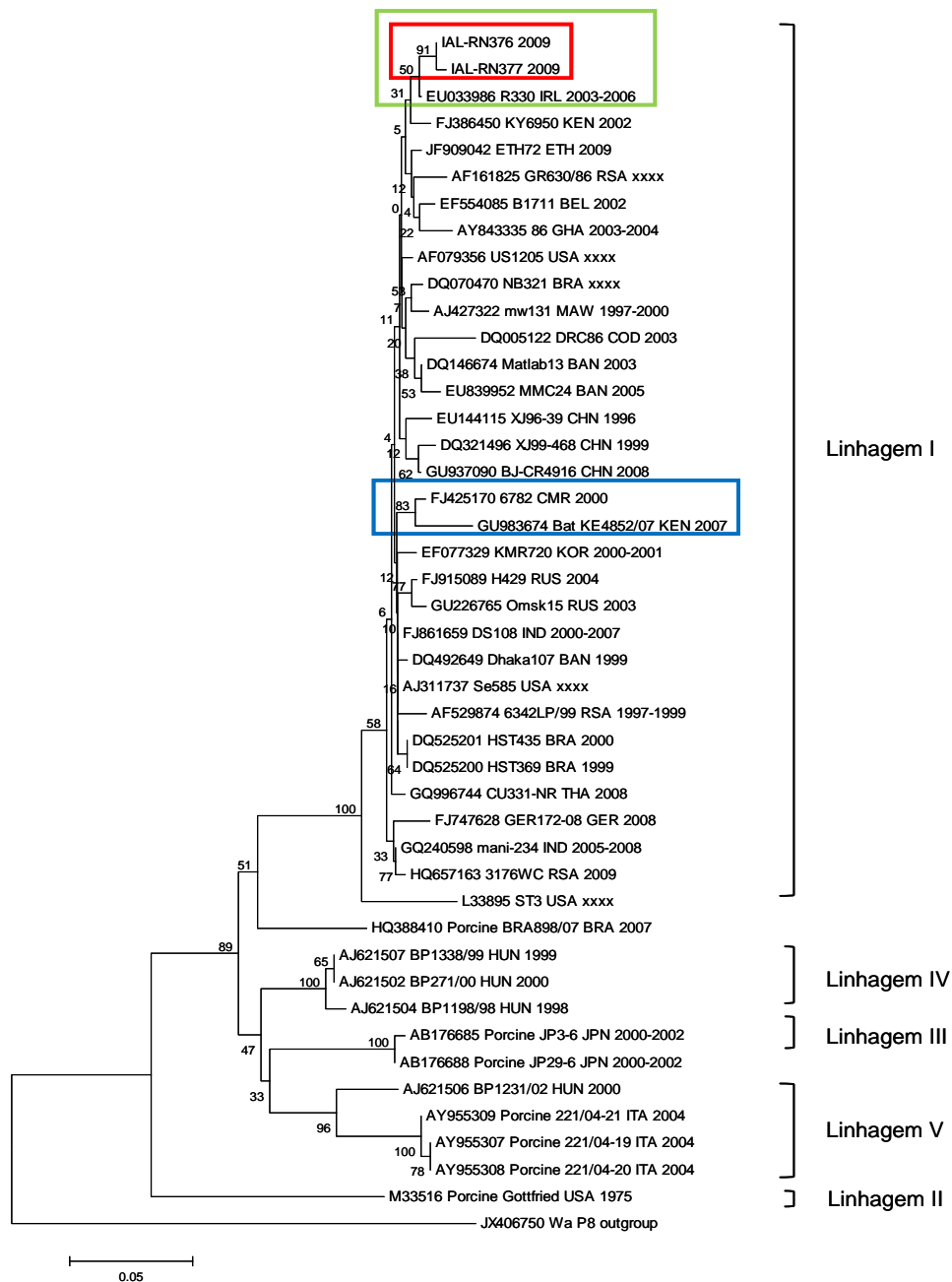


Figura 29. Árvore genealógica do tipo *Neighbor-Joining* (NJ) da sequência aminoácidos deduzida a partir da sequência nucleotídica parcial do gene VP4 de RVA genótipo P[6] das cepas IAL-RN376 e IAL-RN377 (retângulo vermelho) gerada com o software MEGA 4.0. As cepas IAL-RN376 e IAL-RN377 foram detectadas em crianças de 6 e 3 meses de idade, respectivamente, apresentando gastroenterite aguda provenientes de comunidades indígenas localizadas na cidade de Dourados, Estado do Mato Grosso do Sul (MS), Brasil. Sequências P[6] de referência foram obtidas a partir do *GenBank*. O retângulo verde destaca as cepas de RVA com maior percentual de similaridade em relação às cepas IAL-RN376 e IAL-RN377. O retângulo azul destaca as cepas de RVA com maior percentual de similaridade em relação à cepa de morcego KE4852/07. Os números romanos de I a V representam 5 linhagens geneticamente distintas. As espécies e os números de acesso de cada cepa estão indicados. As siglas dos países de cada cepa estão descritas no Anexo 1. A escala indica a diversidade genética. Percentuais dos valores de *bootstrap* estão localizados nos nós dos ramos.

4.1.6 Sequenciamento genômico de cepa de rotavírus do grupo A com genótipo G3P[3]

O sequenciamento completo do gene 9 que codifica para a proteína VP7 e o sequenciamento parcial do gene 4 que codifica para a proteína VP4 foi realizado para a cepa IAL-R2638. A cepa IAL-R2638 recebeu a denominação Hu/G3/IAL-R2638/2011/BRA para a proteína VP7 (número de acesso JN848803) e Hu/P[3]/IAL-R2638/2011/BRA para a proteína VP4 (número de acesso JN848804).

4.1.6.1 Genótipo G3

O produto da sequência de nucleotídeo obtida para a cepa G3 IAL-R2638 foi de 943pb, compreendendo os nucleotídeos 52-994. Para as análises de identidade, comparação com as cepas protótipos e construção da árvore genealógica foram utilizadas sequências de 762pb, contendo as 6 regiões hipervariáveis A-F.

A cepa G3 IAL-R2638 apresentou maior identidade nucleotídica com as cepas caninas A79-10 (96,3%) e CU-1 (95,8%), ambas isoladas nos EUA em 1979 e 1980, respectivamente (Figura 30). A análise comparativa entre a cepa G3 IAL-R2638 e as cepas humanas HCR3A e 6212, detectadas nos EUA, revelou uma identidade de nucleotídeos de 95,2% e 94,2%, respectivamente (Figura 30). A cepa IAL-R2638 exibe relações genéticas com outras cepas tanto de origem animal quanto humana: a cepa canina K9 (94,7%), a cepa felina Cat97 (94,3%), a cepa humana Ro1845 (94,4%) e a cepa canina RV198-95 (94,3%) (Figura 30). O alto percentual de identidade compartilhado entre cepas animais e humanas fica mais evidente na Figura 31.

A cepa G3 IAL-R2638 revelou um valor de identidade genética menor quando comparada com outras cepas de genótipo G3 detectadas em animais, incluindo outras cepas de origem canina e felina (79,7-82%). Quando a cepa G3 IAL-R2638 foi comparada com as outras cepas protótipos de origem humana, as percentagens de identidade nucleotídica variaram de 78,4-89,5% (Figura 30, Figura 31).

A identidade de nucleotídeos encontrada em relação à cepa padrão SA11-H96 de origem símia (RVA/Simian-tc/ZAF/SA11-H96/1958/G3P5B[2] - DQ838620) foi de

82,5%, enquanto em relação à cepa humana G3 HFF7, também de origem brasileira, foi de 79,9% (Figura 30, Figura 31). Além disso, a Figura 25 permite observar que as cepas G3 analisadas estão divididas em dois grupos geneticamente diferentes, denominados nesse estudo, A e B. Ambos os grupos são compostos por cepas G3 de origem animal e humana, detectadas em distintos continentes e períodos. A cepa IAL-R2638, detectada neste estudo, encontra-se situada no grupo A, juntamente com as cepas padrão de origem símia SA11-H96 (DQ838620) e RRV (DQ838620), ambas isoladas nos EUA. O grupo B é composto quase que exclusivamente por cepas de RVA de origem humana com exceção da cepa porcina A131 (L35055) e da cepa felina Cat2 (EU708961).

A sequência de aminoácidos deduzida a partir da cepa IAL-R2638 foi determinada e comparada com as cepas de RVA G3 protótipos (Figura 32). A análise da sequência deduzida de aminoácidos entre a cepa IAL-R2638 e as demais cepas protótipos revelou um percentual de identidade variando de 90,5% a 99,2% (Figura 33). A cepa G3 IAL-R2638 apresentou maior identidade de aminoácidos com a cepa de RVA humana HCR3A (99,2%) isolada nos EUA em 1984, seguido pelas cepas humanas Ro1845 (98,8%), isolada em Israel em 1985 e 6212 (98,0%), isolada nos EUA em 2003 (Figura 33). A cepa IAL-R2638 também apresentou elevada identidade de aminoácidos com cepas de RVA de origem canina A79-10 (98,8%), CU-1 (98,8%), RV198-95 (98,8%) e K9 (98,4%), e com a cepa felina Cat97 (98,8%) (Figura 33). A cepa IAL-R2638 apresentou menor identidade de aminoácidos em relação a cepa murina MeIMuRV (90,5%) (Figura 33).

A proteína VP7 da cepa IAL-R2638 possui um possível sítio de glicosilação N (aminoácido asparagina-Asn) localizado no aminoácido 69, o qual tende a ser conservado para todas as cepas de RVA (Figura 32). As regiões antigênicas da VP7 de A-F corroboram a classificação da cepa IAL-R2638 como genótipo G3. Considerando-se todas as regiões hipervariáveis de A a F, a cepa IAL-R2638 apresentou-se completamente idêntica em relação as cepas de RVA caninas A79-10, CU-1 e RV198-95, em relação as cepas humanas HCR3A e Ro1845 e em relação a cepa felina Cat97 (Figura 32). A região hipervariável B (entre aminoácidos 87 a 101) apresentou-se bastante conservada entre todas as cepas analisadas, ao contrário da região A

(aminoácidos 39 a 50), a qual se mostrou menos conservada (Figura 32).

O alinhamento da sequência de aminoácidos deduzida a partir do gene VP7 revelou substituições na cepa IAL-R2638 dentro da região variável D (aminoácidos 143 a 152) na posição 147 $A \rightarrow T$, região E (aminoácidos 207 a 220) nas posições 212 $A/T \rightarrow V$ e 213 $A/T/N \rightarrow V$ e região F (aminoácidos 233 a 242) na posição 242 $A/N/S \rightarrow V$. Fora das regiões hipervariáveis foi possível observar que houve uma substituição do aminoácido fenilalanina (F), comum a grande maioria das cepas G3 analisadas provenientes de diferentes países e animais, pelo aminoácido leucina (L) na cepa IAL-R2638 na posição 76. Ainda fora das regiões hipervariáveis, a cepa IAL-R2638 apresentou substituições nas posições 66 $A \rightarrow P$, 221 $A \rightarrow T$ e 278 $A \rightarrow V$ (Figura 32).

Embora os percentuais de similaridade de nucleotídeos e aminoácidos obtidos variem quando as diversas cepas de RVA são comparadas entre si, a árvore genealógica construída a partir da sequência deduzida de aminoácidos (Figura 34) permite observar que as relações genéticas entre a cepa IAL-R2638 e as demais cepas protótipos estão mantidas. A Figura 34 também evidencia os dois grupos geneticamente distintos, denominados neste estudo como A e B, da mesma forma que foram destacados na Figura 31.

	IAL-R2638	SA11-H96	Cat2	Cat97	A79-10	K9	CU-1	HCR3A	Ro1845	CMH222	RRV	GRV	J63	30-96	B4106	JE29	HO-5	AU-1	TK28	PA260/97	PAH101/97	4616G11	RUBV3	A131	RV198-95	RV52-96	6212	6235	OS37	MeIMuRV	HFF7	YO	
IAL-R2638		82,5%	79,7%	94,3%	96,3%	94,7%	95,8%	95,2%	94,4%	84,5%	84,3%	83,3%	82,4%	87,1%	86,4%	86,2%	86,0%	79,2%	79,1%	82,0%	79,0%	88,3%	81,8%	81,3%	94,3%	82,0%	94,2%	89,5%	79,5%	76,6%	79,9%	78,4%	
SA11-H96			79,0%	82,0%	82,5%	82,2%	82,2%	83,3%	82,4%	83,0%	83,3%	83,4%	81,1%	80,5%	81,1%	82,8%	82,4%	80,3%	80,0%	82,4%	79,6%	83,5%	80,8%	79,2%	81,8%	82,4%	82,8%	79,9%	78,2%	78,8%	80,5%	79,5%	
Cat2				79,2%	79,2%	78,6%	79,3%	79,1%	79,0%	81,4%	82,5%	81,3%	80,7%	79,2%	78,7%	80,4%	80,1%	90,8%	90,1%	82,0%	90,6%	80,1%	80,9%	85,3%	78,4%	82,1%	78,6%	79,9%	94,6%	74,8%	90,2%	90,4%	
Cat97					95,9%	96,5%	95,1%	94,6%	96,9%	84,7%	84,1%	82,8%	82,8%	88,5%	87,9%	87,2%	87,1%	79,5%	79,7%	83,0%	79,0%	88,5%	82,2%	81,2%	96,8%	82,5%	93,3%	89,5%	78,7%	76,3%	80,0%	78,8%	
A79-10						97,2%	98,6%	97,3%	96,8%	84,6%	83,5%	83,0%	82,9%	88,4%	87,6%	87,4%	87,2%	78,4%	79,0%	81,3%	78,3%	88,5%	82,1%	80,3%	96,7%	81,4%	95,8%	90,5%	78,7%	76,3%	79,6%	77,6%	
K9							96,7%	95,4%	97,7%	84,6%	84,2%	82,9%	83,0%	87,7%	87,5%	87,6%	87,5%	78,0%	78,6%	82,0%	77,6%	88,0%	82,5%	80,7%	97,5%	81,8%	94,0%	90,9%	78,0%	75,9%	78,7%	77,4%	
CU-1								96,8%	96,0%	84,9%	84,3%	83,8%	83,2%	88,0%	87,2%	87,5%	87,4%	78,7%	79,1%	81,8%	78,4%	88,3%	82,6%	80,4%	95,9%	82,0%	95,2%	89,7%	78,8%	76,9%	79,7%	78,0%	
HCR3A									95,2%	84,6%	83,5%	83,7%	82,8%	88,0%	86,7%	86,8%	86,7%	78,6%	79,1%	81,3%	78,7%	87,5%	82,5%	80,9%	95,4%	81,4%	96,5%	89,8%	78,6%	76,6%	79,6%	78,2%	
Ro1845										84,9%	84,5%	83,2%	82,9%	88,3%	87,9%	87,6%	87,5%	78,7%	79,2%	82,5%	78,6%	88,3%	82,4%	81,4%	98,5%	82,4%	93,9%	90,9%	78,7%	76,2%	79,1%	78,0%	
CMH222											87,9%	87,6%	86,4%	84,1%	84,2%	85,6%	85,4%	80,4%	80,4%	87,9%	80,1%	85,3%	85,5%	81,6%	84,3%	88,0%	84,9%	85,3%	80,1%	76,1%	81,7%	79,9%	
RRV												89,2%	87,7%	82,9%	83,4%	86,3%	85,9%	82,1%	82,1%	91,2%	81,6%	86,0%	86,7%	80,9%	83,4%	91,0%	83,5%	84,6%	81,6%	77,9%	81,8%	81,7%	
GRV													88,0%	82,9%	82,8%	85,0%	84,6%	80,8%	80,5%	87,4%	80,0%	85,3%	87,2%	80,9%	82,9%	87,7%	83,4%	82,4%	80,9%	76,3%	81,6%	80,1%	
J63														83,3%	82,8%	85,9%	85,6%	80,0%	79,3%	85,5%	79,3%	85,4%	97,7%	80,1%	82,4%	85,8%	82,9%	83,0%	79,9%	74,8%	80,3%	79,9%	
30-96															94,4%	86,6%	86,2%	79,3%	79,2%	83,0%	79,1%	86,4%	83,5%	79,2%	88,0%	82,8%	88,5%	86,4%	78,6%	79,5%	78,6%		
B4106																86,8%	86,7%	79,3%	79,7%	83,2%	78,6%	87,2%	83,2%	78,8%	87,9%	82,8%	86,4%	85,8%	77,2%	77,5%	80,1%	78,6%	
JE29																	99,6%	80,4%	80,1%	84,1%	79,9%	92,9%	85,3%	81,3%	87,4%	83,9%	87,2%	87,1%	80,1%	76,2%	80,9%	79,6%	
HO-5																		80,1%	79,9%	83,7%	79,6%	92,7%	85,1%	81,1%	87,2%	83,5%	87,1%	87,0%	79,9%	76,1%	80,7%	79,3%	
AU-1																				96,8%	81,6%	95,9%	80,5%	79,6%	85,9%	78,2%	81,7%	79,3%	79,3%	90,8%	74,5%	93,4%	98,1%
TK28																																	
PA260/97																																	
PAH101/97																																	
4616G11																																	
RUBV3																																	
A131																																	
RV198-95																																	
RV52-96																																	
6212																																	
6235																																	
OS37																																	
MeIMuRV																																	
HFF7																																	
YO																																	



Figura 30. Matriz de identidade das sequências nucleotídicas parciais do gene VP7 de RVA genótipo G3 gerada com o software *BioEdit* (Ibis Therapeutics, EUA). A cepa IAL-R2638 foi detectada em uma criança de 1 ano de idade apresentando gastroenterite aguda proveniente de uma creche localizada na cidade de Guarulhos, Estado de São Paulo (SP), Brasil. Sequências G3 de referência foram obtidas a partir do *GenBank*.

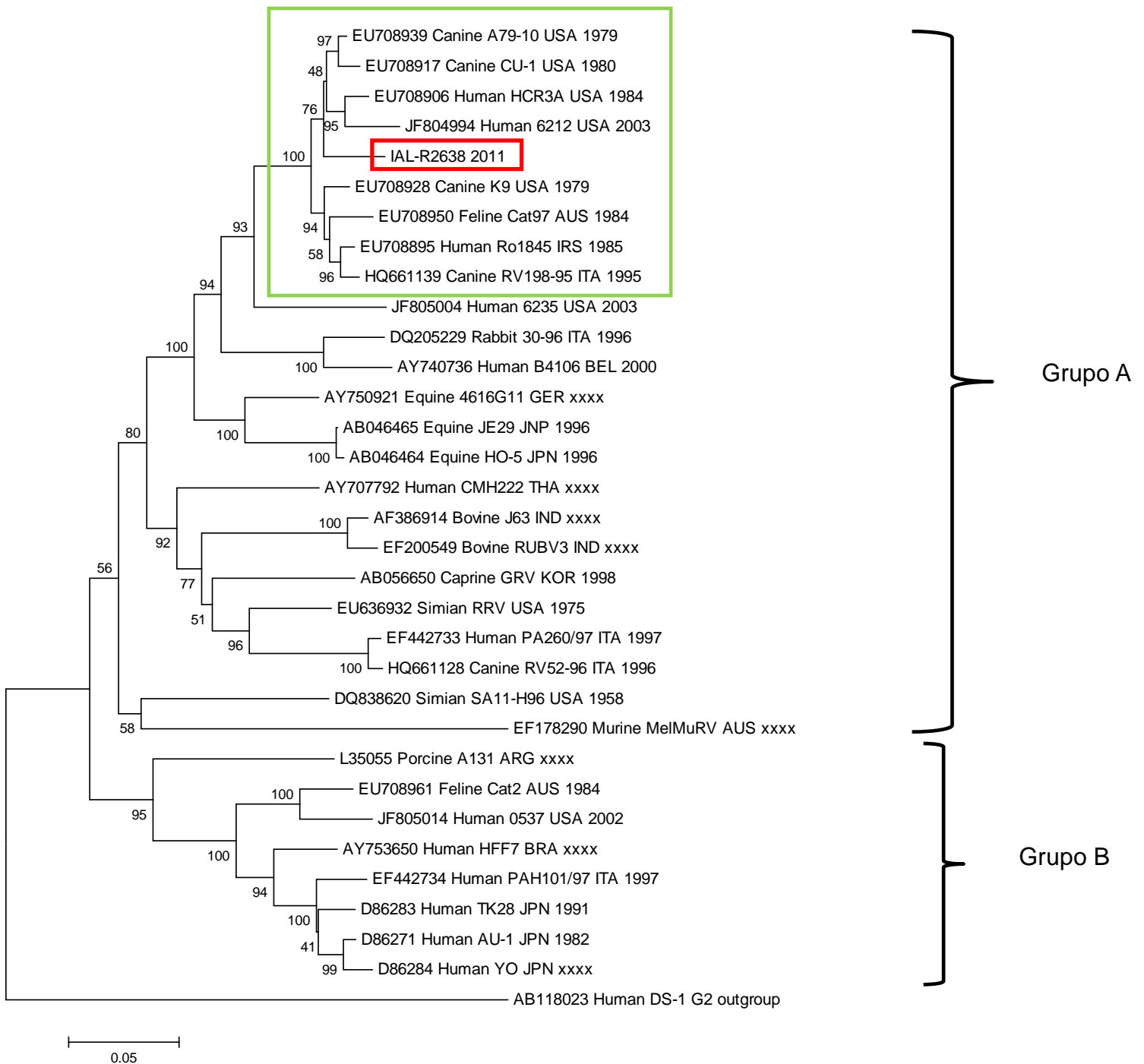
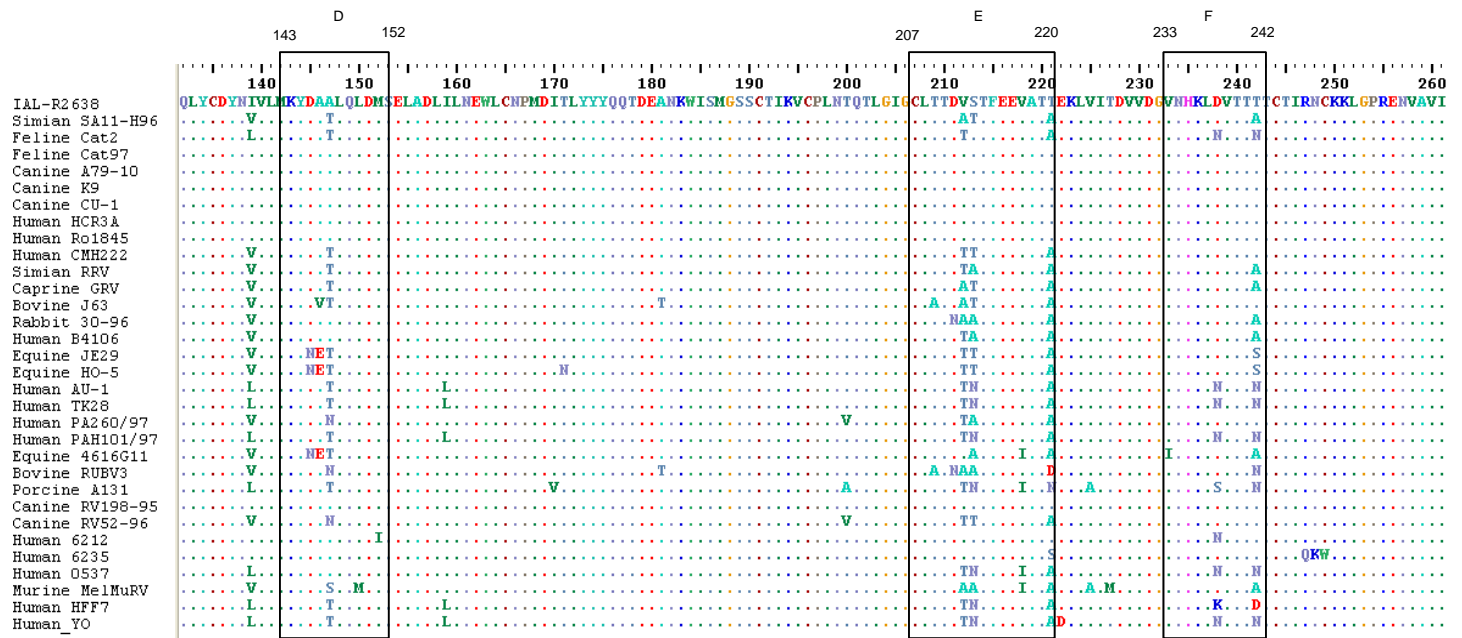
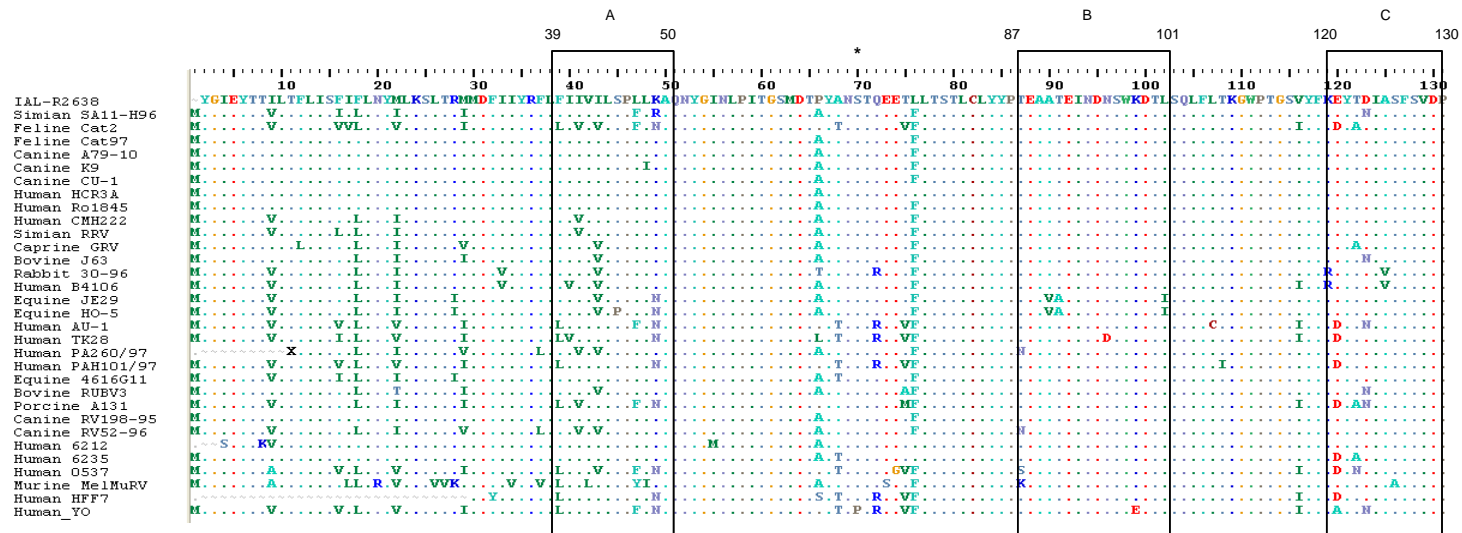


Figura 31. Árvore genealógica do tipo *Neighbor-Joining* (NJ) da sequência nucleotídica parcial do gene VP7 de RVA genótipo G3 da cepa IAL-R2638 (retângulo vermelho) gerada com o software MEGA 4.0. A cepa IAL-R2638 foi detectada em uma criança de 1 ano de idade apresentando gastroenterite aguda proveniente de uma creche localizada na cidade de Guarulhos, Estado de São Paulo (SP), Brasil. Sequências G3 de referência foram obtidas a partir do *GenBank*. O retângulo verde destaca as cepas de RVA com maior percentual de similaridade em relação a cepa IAL-R2638. A e B representam dois grupos geneticamente diferentes. As espécies e os números de acesso de cada cepa estão indicados. As siglas dos países de cada cepa estão descritas no Anexo 1. A escala indica a diversidade genética. Percentuais dos valores de *bootstrap* estão localizados nos nós dos ramos.



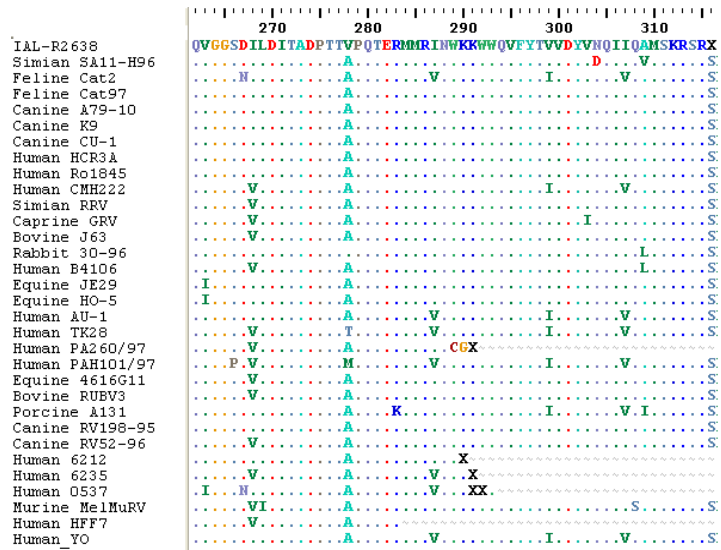


Figura 32. Alinhamento da sequência de aminoácidos deduzida a partir da sequência de nucleotídeos do gene VP7 entre a cepa G3 IAL-R2638 e as cepas protótipos. As regiões hipervariáveis A-F estão indicadas. O sítio de glicosilação N (aminoácido 69) está indicado por asteriscos. As abreviações referentes aos aminoácidos estão listadas no Anexo 2.

	IAL-R2638	SA11-H96	Cat2	Cat97	A79-10	K9	CU-1	HCR3A	Ro1845	CMH222	RRV	GRV	J63	30-96	B4106	JE29	HO-5	AU-1	TK28	PA260/97	PAH101/97	4616G11	RUBV3	A131	RV198-95	RV52-96	6212	6235	O537	MelMuRV	HFF7	YO	
IAL-R2638		95,2%	92,5%	98,8%	98,8%	98,4%	98,8%	99,2%	98,8%	96,0%	95,6%	95,2%	94,4%	94,8%	94,0%	93,3%	92,5%	92,1%	91,7%	94,4%	92,5%	94,4%	93,7%	90,9%	98,8%	94,4%	98,0%	96,0%	91,3%	90,5%	92,1%	91,3%	
SA11-H96			93,3%	96,4%	96,4%	96,0%	96,4%	96,0%	96,4%	97,2%	97,2%	97,6%	96,8%	94,8%	94,8%	95,2%	94,4%	94,0%	92,1%	94,8%	92,5%	95,6%	95,2%	92,5%	96,4%	95,2%	94,8%	93,3%	91,7%	92,5%	92,9%	93,3%	
Cat2				92,9%	92,9%	92,5%	92,9%	92,5%	92,9%	93,7%	93,7%	93,7%	91,7%	90,9%	92,1%	92,1%	91,3%	96,4%	94,8%	92,5%	94,8%	91,7%	91,3%	94,8%	92,9%	92,5%	92,1%	92,1%	96,8%	88,1%	94,8%	95,2%	
Cat97					100,0%	99,6%	100,0%	99,6%	100,0%	97,2%	96,8%	96,4%	95,6%	94,8%	95,2%	94,4%	93,7%	92,5%	92,1%	95,6%	92,5%	95,6%	94,8%	91,3%	100,0%	95,6%	98,4%	96,4%	91,7%	91,7%	92,9%	91,7%	
A79-10						99,6%	100,0%	99,6%	100,0%	97,2%	96,8%	96,4%	95,6%	94,8%	95,2%	94,4%	93,7%	92,5%	92,1%	95,6%	92,5%	95,6%	94,8%	91,3%	100,0%	95,6%	98,4%	96,4%	91,7%	91,7%	92,9%	91,7%	
K9							99,6%	99,2%	99,6%	96,8%	96,4%	96,0%	95,2%	94,4%	94,8%	94,0%	93,3%	92,1%	91,7%	95,2%	92,1%	95,2%	94,4%	90,9%	99,6%	95,2%	98,0%	96,0%	91,3%	92,1%	92,5%	91,3%	
CU-1								99,6%	100,0%	97,2%	96,8%	96,4%	95,6%	94,8%	95,2%	94,4%	93,7%	92,5%	92,1%	95,6%	92,5%	95,6%	94,8%	91,3%	100,0%	95,6%	98,4%	96,4%	91,7%	91,7%	92,9%	91,7%	
HCR3A									99,6%	96,8%	96,4%	96,0%	95,2%	94,4%	94,8%	94,0%	93,3%	92,1%	91,7%	95,2%	92,1%	95,2%	94,4%	90,9%	99,6%	95,2%	98,8%	96,8%	91,3%	91,3%	92,5%	91,3%	
Ro1845										97,2%	96,8%	96,4%	95,6%	94,8%	95,2%	94,4%	93,7%	92,5%	92,1%	95,6%	92,5%	95,6%	94,8%	91,3%	100,0%	95,6%	98,4%	96,4%	91,7%	91,7%	92,9%	91,7%	
CMH222											99,2%	98,0%	97,2%	94,4%	96,0%	95,6%	94,8%	92,9%	93,3%	97,6%	93,7%	96,4%	95,2%	92,1%	97,2%	98,0%	95,6%	94,8%	91,3%	92,5%	94,0%	92,1%	
RRV												98,0%	96,4%	95,2%	96,8%	95,2%	94,4%	92,9%	93,3%	97,6%	93,7%	97,2%	95,6%	92,1%	96,8%	97,2%	95,2%	94,4%	91,3%	93,3%	94,0%	92,1%	
GRV													97,6%	95,6%	96,4%	95,6%	94,8%	92,1%	92,5%	96,4%	92,9%	96,4%	96,0%	91,3%	96,4%	96,8%	94,8%	94,8%	91,7%	92,9%	93,3%	91,3%	
J63														94,0%	94,8%	94,0%	91,7%	91,3%	95,6%	91,7%	95,2%	97,2%	90,1%	95,6%	96,0%	94,0%	93,3%	90,1%	91,3%	92,1%	90,9%		
30-96															96,8%	92,9%	92,1%	90,9%	90,9%	94,0%	91,3%	93,7%	94,4%	88,5%	94,8%	93,7%	93,3%	91,7%	90,1%	90,5%	91,3%	90,1%	
B4106																93,7%	92,9%	91,3%	92,5%	95,6%	91,3%	94,8%	94,4%	89,7%	95,2%	95,2%	93,7%	92,9%	91,3%	91,3%	92,5%	90,5%	
JE29																	99,2%	91,3%	90,9%	94,0%	91,3%	94,8%	92,9%	89,7%	94,4%	94,4%	92,9%	91,3%	91,3%	89,3%	91,7%	90,5%	
HO-5																		90,5%	90,1%	93,3%	90,5%	94,0%	92,1%	88,9%	93,7%	93,7%	92,1%	90,5%	90,5%	88,5%	90,9%	89,7%	
AU-1																				96,8%	90,9%	96,8%	91,7%	91,3%	94,4%	92,5%	91,7%	90,9%	95,2%	88,1%	96,8%	98,0%	
TK28																																	95,6%
PA260/97																																	90,1%
PAH101/97																																	95,6%
4616G11																																	90,9%
RUBV3																																	90,5%
A131																																	93,3%
RV198-95																																	91,7%
RV52-96																																	90,1%
6212																																	89,7%
6235																																	90,9%
O537																																	88,1%
MelMuRV																																	88,9%
HFF7																																	95,6%
YO																																	



Figura 33. Matriz de identidade das sequências deduzidas de aminoácidos a partir das sequências nucleotídicas parciais do gene VP7 de RVA genótipo G3 gerada com o software *BioEdit* (Ibis Therapeutics, EUA). A cepa IAL-R2638 foi detectada em uma criança de 1 ano de idade apresentando gastroenterite aguda proveniente de uma creche localizada na cidade de Guarulhos, Estado de São Paulo (SP), Brasil. Sequências G3 de referência foram obtidas a partir do *GenBank*.

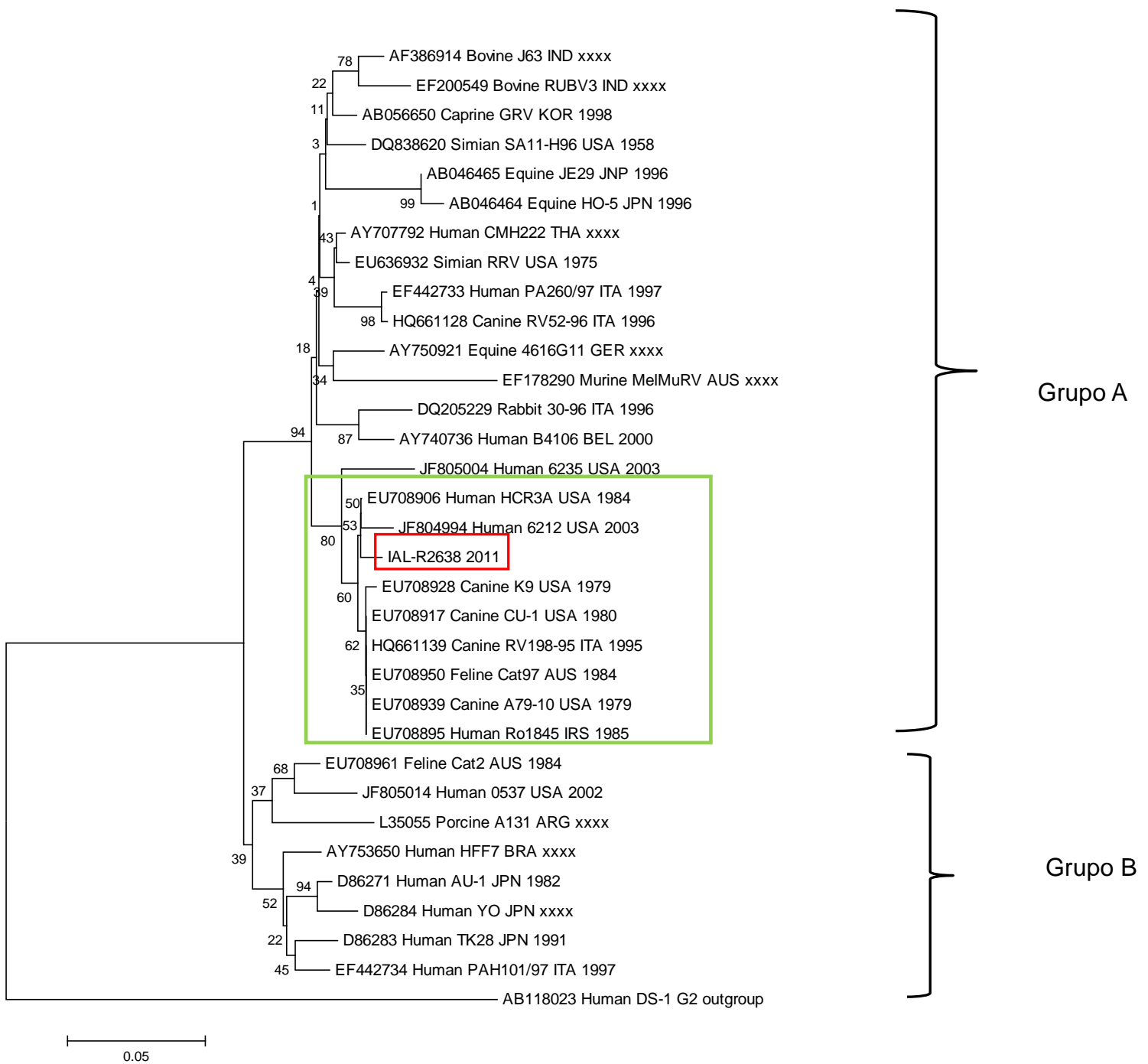


Figura 34. Árvore genealógica do tipo *Neighbor-Joining* (NJ) da sequência aminoácidos deduzida a partir da sequência nucleotídica parcial do gene VP7 de RVA genótipo G3 da cepa IAL-R2638 (retângulo vermelho) gerada com o software MEGA 4.0. A cepa IAL-R2638 foi detectada em uma criança de 1 ano de idade apresentando gastroenterite aguda proveniente de uma creche localizada na cidade de Guarulhos, Estado de São Paulo (SP), Brasil. Sequências G3 de referência foram obtidas a partir do *GenBank*. O retângulo verde destaca as cepas de RVA com maior percentual de similaridade em relação à cepa IAL-R2638. A e B representam dois grupos geneticamente diferentes. As espécies e os números de acesso de cada cepa estão indicados. As siglas dos países de cada cepa estão descritas no Anexo 1. A escala indica a diversidade proteica. Percentuais dos valores de *bootstrap* estão localizados nos nós dos ramos.

4.1.6.2 Genótipo P[3]

O tamanho da sequência de nucleotídeos obtida para a cepa P[3] IAL-R2638 foi de 765pb (nucleotídeos 65-829). Para as análises de identidade, comparação com as cepas protótipos e construção da árvore genealógica todas as sequências apresentaram o tamanho final de 765pb, contendo a região hipervariável (aminoácidos 71-204).

A cepa P[3] IAL-R2638 apresentou maior identidade nucleotídica com as cepas caninas RV52/96 (94,2%) e K9 (94,2%), isoladas na Itália em 1996 e nos EUA em 1979, respectivamente (Figura 35, Figura 36). A análise comparativa entre a cepa P[3] IAL-R2638 e as cepas humanas HCR3A, 6212, 6235 e Ro1845 detectadas nos EUA e Israel, revelou uma identidade de nucleotídeos variando de 92,1% a 93,9% (Figura 35, Figura 36). Ainda, a cepa IAL-R2638 exibe relações genéticas com as cepas felinas Cat97 (92,5%) e FRV64 (92,4%) (Figura 35). O alto percentual de identidade compartilhado entre cepas animais e humanas fica mais evidente na Figura 36.

A identidade de nucleotídeos encontrada para a cepa IAL-R2638 em relação à cepa padrão de origem símia RRV (RVA/Simiantc/USA/RRV/1975/G3P[3] - EU636927) foi de 77,7% (Figura 35). A Figura 36 permite visualizar que as cepas P[3] analisadas estão discriminadas em dois grupos geneticamente distintos, designados nesse estudo por C e D. Ambos os grupos são compostos por cepas P[3] de origem animal e humana, detectadas em países e períodos diferentes. A cepa IAL-R2638, detectada nesse estudo, exibiu identidade nucleotídica mais elevada com as cepas que compõem o grupo C (92,1-94,2%), enquanto valores de identidades gênicas menores (77,5-77,7%) foram observados entre a cepa P[3] IAL-R2638 e o grupo D (Figura 35).

A sequência de aminoácidos deduzida a partir da cepa IAL-R2638 foi determinada e comparada com as cepas de RVA P[3] protótipos (Figura 37). A análise da sequência deduzida de aminoácidos entre a cepa IAL-R2638 e as demais cepas protótipos revelou um percentual de identidade variando de 84,2% a 96,8% (Figura 38). A cepa P[3] IAL-R2638 apresentou maior identidade de

aminoácidos com a cepa de RVA canina RV52/96 (96,8%), seguido pelas cepas FRV64 (felina), HCR3A (humana) e K9 (canina) com 96,4% (Figura 38). A cepa IAL-R2638 apresentou menor identidade de aminoácidos em relação a cepa símia RRV (84,2%) (Figura 38).

A proteína VP4 da cepa IAL-R2638 apresentou os sítios de clivagem pela tripsina conservados e localizados nos resíduos de arginina (R) 231 e 241. O terceiro resíduo de arginina na posição 247 foi substituído por lisina (K) na cepa IAL-R2638, assim como nas cepas felina Cat97 e FRV64; nas cepas caninas A79-10, K9, CU-1 e RV52/96, e nas cepas humanas HCR3A, Ro1845, 6212 e 6235. As cisteínas (C) conservadas das posições 203 e 216, e os resíduos de prolina (P) conservados das posições 68, 71, 225 e 226 estão presentes na cepa IAL-R2638 (Figura 37).

O alinhamento da sequência de aminoácidos deduzida a partir do gene VP4 da cepa IAL-R2638 revelou que a região hipervariável da subunidade VP8* (entre os aminoácidos 71 e 204) está bastante conservada entre todas as cepas analisadas, corroborando a classificação da cepa IAL-R2638 como genótipo P[3]. Uma evidente substituição de aminoácidos foi observada unicamente na cepa IAL-R2638, a qual trocou glutamina (Q) e asparagina (N) nas posições 148 e 149 por leucina (L) e serina (S), respectivamente. Ainda, considerando a região hipervariável da subunidade VP8*, foi possível observar a substituição do aminoácido tirosina (Y) por histidina (H) na posição 155 da cepa IAL-R2638, a qual também é compartilhada pelas cepas K9 (canina), HCR3A (humana) e 6212 (humana). Outras duas substituições dentro da região hipervariável da cepa IAL-R2638 foram observadas nas posições 92^{I→V} e 201^{A→T} (Figura 37).

Outras substituições de resíduos de aminoácidos foram observadas fora da região hipervariável: (i) uma inversão nos resíduos de aminoácidos isoleucina (I) e valina (V) ocorreram nas posições 233 e 234 da cepa IAL-R2638 quando comparada as demais cepas protótipos, e (ii) 245^{S→P} na cepa IAL-R2638, esta última compartilhada apenas pela cepa humana Ro1845 (Figura 37).

Embora os percentuais de similaridade de aminoácidos sejam maiores que os percentuais de similaridade de nucleotídeos, a árvore genealógica construída a

partir da sequência deduzida de aminoácidos (Figura 39) permite observar que as relações genéticas entre a cepa IAL-R2638 e as demais cepas protótipos estão mantidas. A Figura 39 também evidencia os dois grupos geneticamente distintos, denominados neste estudo como C e D, da mesma forma que foram destacados na Figura 36.

	IAL-R2638	RRV	Cat97	A79-10	K9	CU-1	HCR3A	Ro1845	CMH222	GRV	FRV64	10733	RV52/96	6212	6235
IAL-R2638		77,7%	92,5%	92,1%	94,2%	92,2%	93,9%	92,1%	77,5%	77,5%	92,4%	77,5%	94,2%	92,1%	92,8%
RRV			77,5%	78,3%	77,5%	78,0%	78,0%	77,9%	82,8%	83,6%	78,0%	96,0%	79,6%	78,0%	78,1%
Cat97				94,1%	95,2%	93,9%	95,4%	95,2%	78,1%	77,9%	96,2%	77,9%	94,7%	94,5%	94,9%
A79-10					95,1%	96,3%	94,9%	93,3%	78,5%	78,8%	93,8%	78,4%	94,1%	93,9%	94,1%
K9						95,2%	98,1%	95,0%	77,6%	78,1%	96,0%	78,3%	95,6%	96,2%	95,8%
CU-1							95,0%	93,8%	77,5%	77,6%	94,2%	78,0%	93,7%	93,5%	93,9%
HCR3A								94,9%	77,3%	78,1%	95,6%	78,1%	96,0%	96,2%	96,0%
Ro1845									78,0%	78,3%	98,1%	77,9%	93,8%	93,3%	92,9%
CMH222										91,2%	78,5%	82,6%	78,3%	78,5%	78,5%
GRV											78,8%	83,2%	78,5%	78,5%	78,0%
FRV64												78,3%	94,3%	94,2%	93,8%
10733													79,6%	78,6%	78,3%
RV52/96														94,2%	94,6%
6212															96,4%
6235															

■ Símio

■ Felino

■ Canino

■ Humano

■ Caprino

■ Búfalo

Figura 35. Matriz de identidade das sequências nucleotídicas parciais do gene VP4 de RVA genótipo P[3] gerada com o software *BioEdit* (Ibis Therapeutics, EUA). A cepa IAL-R2638 foi detectada em uma criança de 1 ano de idade apresentando gastroenterite aguda proveniente de uma creche localizada na cidade de Guarulhos, Estado de São Paulo (SP), Brasil. Sequências P[3] de referência foram obtidas a partir do *GenBank*.

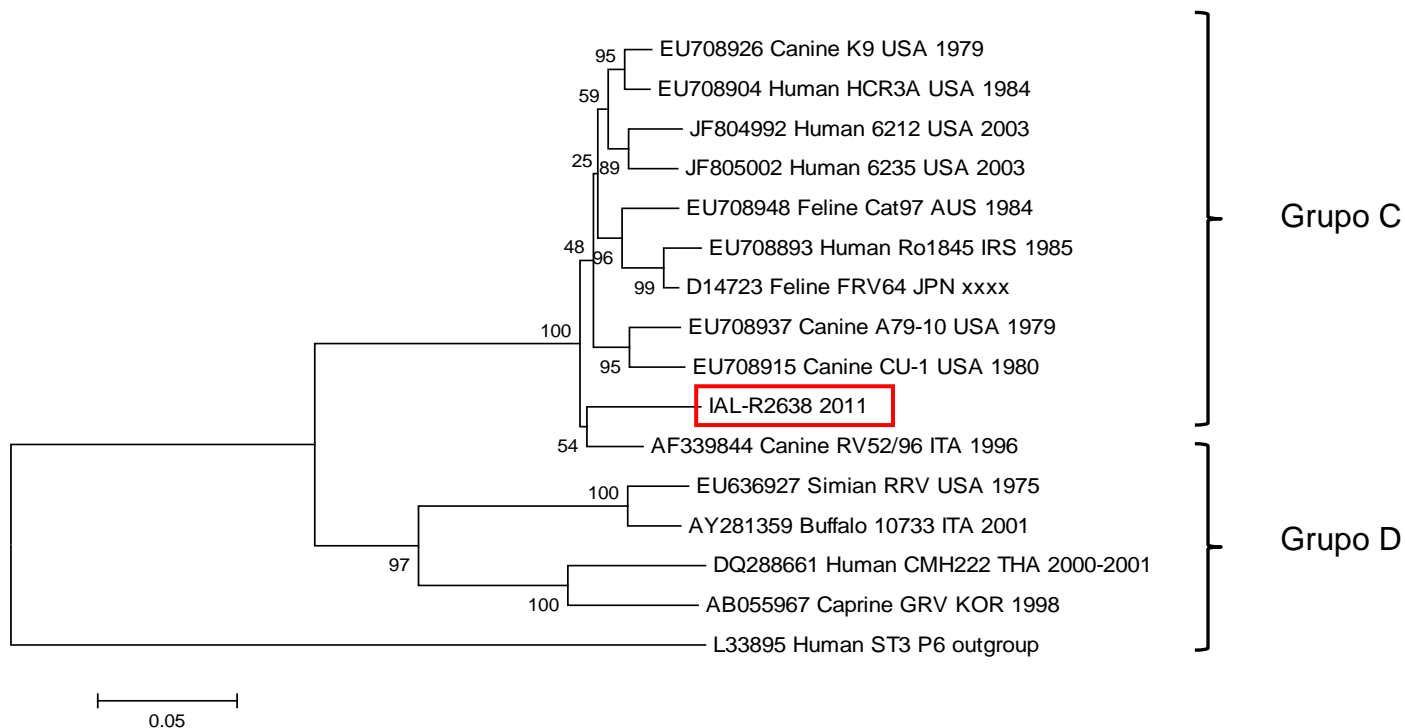
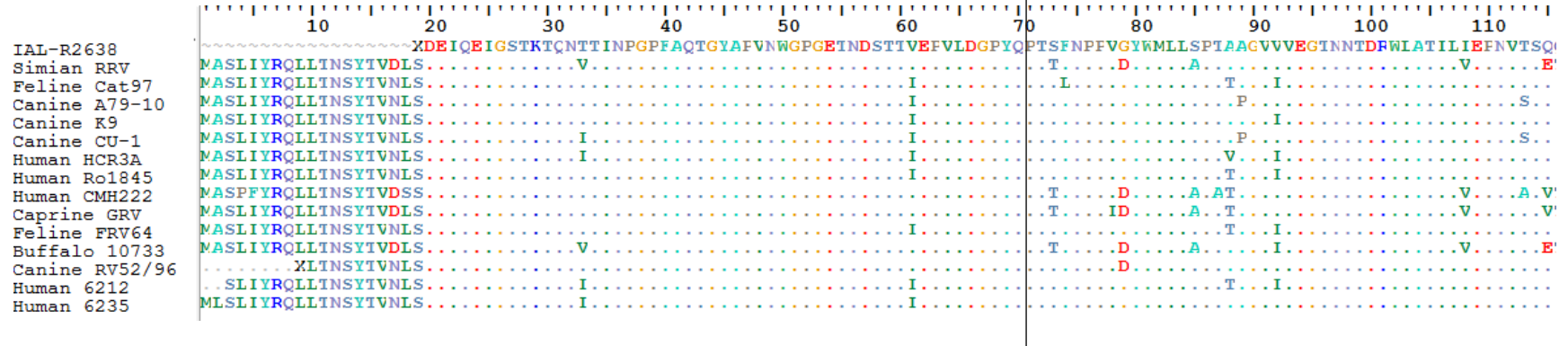


Figura 36. Árvore genealógica do tipo *Neighbor-Joining* (NJ) da sequência nucleotídica parcial do gene VP4 de RVA genótipo P[3] da cepa IAL-R2638 (retângulo vermelho) gerada com o software MEGA 4.0. A cepa IAL-R2638 foi detectada em uma criança de 1 ano de idade apresentando gastroenterite aguda provenientes de uma creche localizada na cidade de Guarulhos, Estado de São Paulo (SP), Brasil. Sequências P[3] de referência foram obtidas a partir do *GenBank*. C e D representam dois grupos geneticamente diferentes. As espécies e os números de acesso de cada cepa estão indicados. As siglas dos países de cada cepa estão descritas no Anexo 1. A escala indica a diversidade genética. Percentuais dos valores de *bootstrap* estão localizados nos nós dos ramos.

Região hipervariável

71



Região hipervariável

204



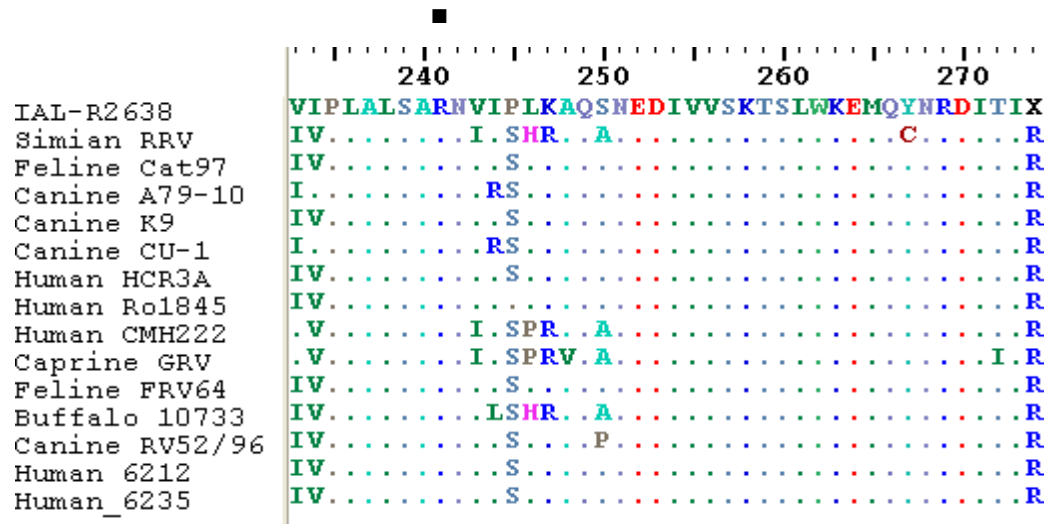


Figura 37. Alinhamento da sequência de aminoácidos deduzida a partir da sequência de nucleotídeos do gene VP4 entre a cepa P[3] IAL-R2638 e as cepas protótipos. Os resíduos conservados de cisteínas (▼), prolínas (●), argininas (■) e a região hipervariável estão indicados. As abreviações referentes aos aminoácidos estão listadas no Anexo 2.

	IAL-R2638	RRV	Cat97	A79-10	K9	CU-1	HCR3A	Ro1845	CMH222	GRV	FRV64	10733	RV52/96	6212	6235
IAL-R2638		84,2%	96,0%	95,6%	96,4%	95,6%	96,4%	96,0%	84,6%	86,2%	96,4%	85,0%	96,8%	96,0%	96,8%
RRV			85,0%	84,6%	84,6%	84,2%	85,0%	85,0%	90,5%	90,9%	85,4%	96,4%	87,0%	85,4%	86,2%
Cat97				96,4%	98,0%	96,4%	98,4%	98,4%	85,4%	87,0%	99,6%	86,6%	97,6%	98,4%	98,4%
A79-10					96,0%	98,4%	96,0%	95,6%	84,6%	85,8%	96,8%	85,8%	96,4%	96,4%	97,2%
K9						96,0%	98,4%	97,2%	84,6%	86,2%	98,4%	86,2%	97,2%	98,0%	98,0%
CU-1							96,8%	95,6%	83,8%	85,0%	96,8%	85,4%	96,4%	96,4%	98,0%
HCR3A								97,6%	84,6%	86,2%	98,8%	86,6%	97,2%	99,2%	98,8%
Ro1845									84,6%	86,2%	98,8%	86,6%	96,8%	97,6%	97,6%
CMH222										95,6%	85,8%	90,1%	86,6%	85,4%	85,4%
GRV											87,4%	90,5%	88,1%	87,0%	87,0%
FRV64												87,0%	98,0%	98,8%	98,8%
10733													87,7%	87,0%	87,0%
RV52/96														96,8%	98,4%
6212															98,4%
6235															



Figura 38. Matriz de identidade das sequências deduzidas de aminoácidos a partir das sequências nucleotídicas parciais do gene VP4 de RVA genótipo P[3] gerada com o software *BioEdit* (Ibis Therapeutics, EUA). A cepa IAL-R2638 foi detectada em uma criança de 1 ano de idade apresentando gastroenterite aguda proveniente de uma creche localizada na cidade de Guarulhos, Estado de São Paulo (SP), Brasil. Sequências P[3] de referência foram obtidas a partir do *GenBank*.

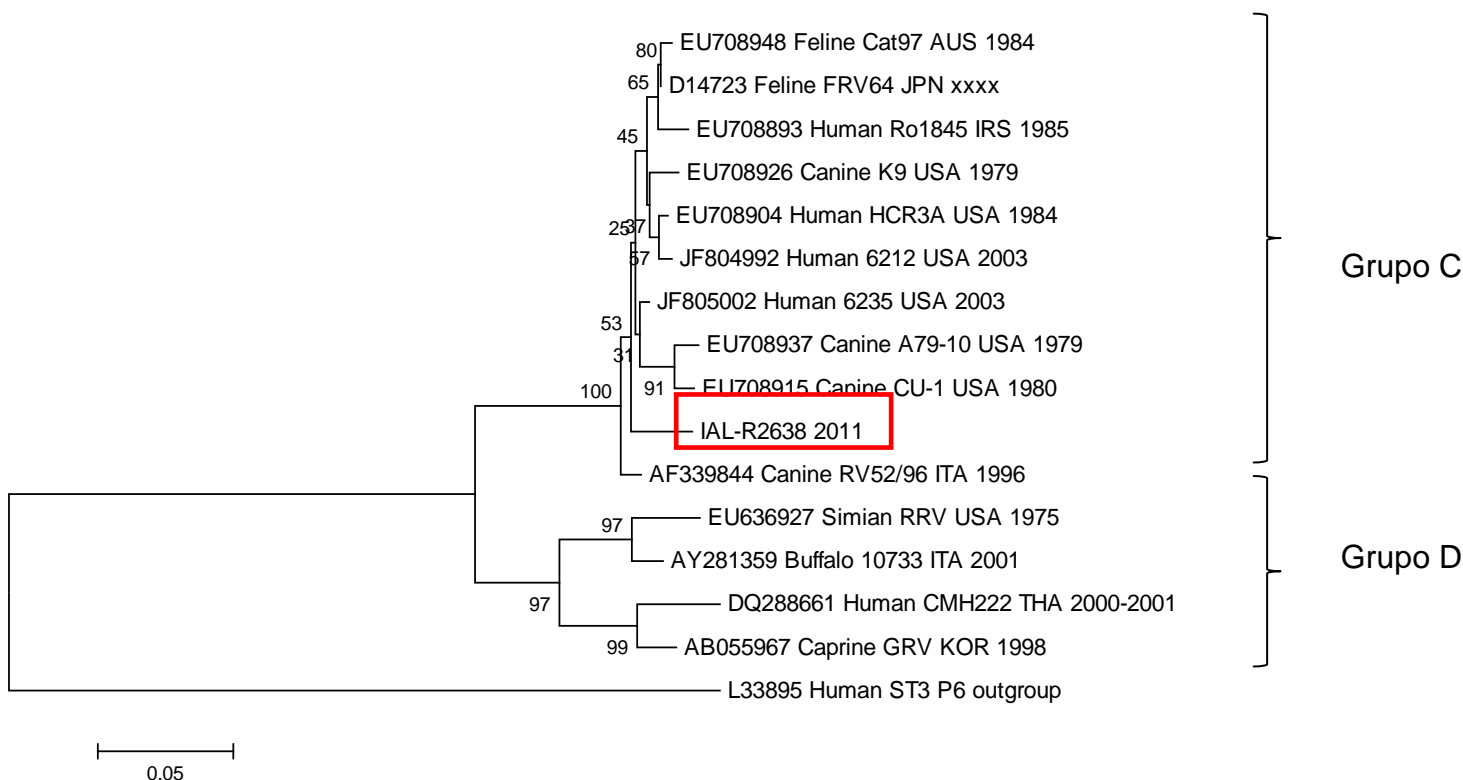


Figura 39. Árvore genealógica do tipo *Neighbor-Joining* (NJ) da sequência aminoácidos deduzida a partir da sequência nucleotídica parcial do gene VP4 de RVA genótipo P[3] da cepa IAL-R2638 (retângulo vermelho) gerada com o software MEGA 4.0. A cepa IAL-R2638 foi detectada em uma criança de 1 ano de idade apresentando gastroenterite aguda proveniente de uma creche localizada na cidade de Guarulhos, Estado de São Paulo (SP), Brasil. Sequências P[3] de referência foram obtidas a partir do *GenBank*. C e D representam dois grupos geneticamente diferentes. As espécies e os números de acesso de cada cepa estão indicados. As siglas dos países de cada cepa estão descritas no Anexo 1. A escala indica a diversidade genética. Percentuais dos valores de *bootstrap* estão localizados nos nós dos ramos.

4.1.7 Sequenciamento genômico de cepa de rotavírus do grupo A com genótipo G10P[?]

O sequenciamento parcial do gene 9 que codifica para a proteína VP7 foi realizado para a cepa IAL-R2803 utilizando o produto da 2ª amplificação (na 1ª amplificação não houve visualização do fragmento), recebendo a denominação RVA/Human-wt/BRA/IAL-R2803/2012/G10P[x] (número de acesso JX566991). Não foi possível amplificar o gene codificador da proteína VP4 para a cepa IAL-R2803.

4.1.7.1 Genótipo G10

O tamanho da sequência de nucleotídeo obtida para a cepa G10 IAL-R2803 foi de 579pb (nucleotídeos 49-601). Para as análises de identidade, comparação com as cepas protótipos e construção da árvore genealógica, todas as sequências apresentaram o tamanho final de 579pb, contendo 4 regiões hipervariáveis (A-D).

A cepa G10 IAL-R2803 apresentou maior identidade nucleotídica com a cepa bovina DQ-75 (94,6%) isolada na China em 2008 (Figura 40). A cepa IAL-R2803 também exibe relações genéticas com outras cepas animais e humanas: com as cepas bovinas RVL-Bov2 (93,6%), VICG10.01 (93,6%), RVL-Bov3 (93,4%), B11 (93,4%), XJX-07 (93,4%) e MX001 (92,9%), e com a cepa humana 163 (93,4%) isolada no Vietnã em 2008 (Figura 40). O alto percentual de identidade compartilhado entre a cepa IAL-R2803 e as cepas bovinas fica evidente na Figura 31. A análise comparativa entre a cepa G10 IAL-R2803 e as demais cepas humanas revelou identidade de nucleotídeos variando de 84,8% a 89,9% (Figura 40).

A sequência parcial de nucleotídeos da cepa IAL-R2803 também foi comparada com a cepa G10 porcina P343 (89,8%), com a cepa de camelo (ungulados artiodáctilos) VRLCU (87,3%), cepas caprinas LLR (85,1%) e Lamb-NT (84,6%) e com a cepa equina Erv2 (85,4%). A identidade de nucleotídeos encontrada em relação à cepa padrão de origem bovina B223 (X57852) foi de

92,4%. Quando a cepa IAL-R2803 foi comparada com a cepa humana brasileira R239 detectada no Rio de Janeiro (RJ), o percentual de identidade foi de 86,1% (Figura 40, Figura 41).

A Figura 41 permite observar que as cepas G10 analisadas estão divididas em dois grupos geneticamente diferentes, denominados nesse estudo E e F. O grupo E é composto, em sua maior parte, por cepas de origem bovina, enquanto o grupo F é formado principalmente por cepas G10 humanas, com exceção de duas cepas animais: a cepa equina Erv2 e a cepa bovina E29TR. A cepa IAL-R2803, detectada neste estudo, encontra-se situada no grupo E, juntamente com as cepas bovinas, incluindo a cepa padrão bovina B223 (X57852) e 2 cepas humanas (163 e SI-R241/07).

A árvore filogenética também permitiu identificar 8 linhagens distintas, chamadas nesse estudo de I a VIII. A primeira linhagem (I) é composta unicamente por uma cepa humana (R239) isolada no Brasil em 2000-2004. A segunda linhagem (II) é ocupada pelas cepas LLR e Lamb-NT, ambas isoladas a partir de cordeiros chineses e distintas de todas as outras cepas G10 analisadas neste estudo. A terceira linhagem (III) consiste em 6 cepas humanas e uma única cepa bovina (E29TR) proveniente da Turquia. A linhagem IV é composta por 2 cepas humanas (Mc345 e mani-265) e pela cepa equina indiana Erv2. A quinta linhagem (V) é formada unicamente pela cepa humana SI-R241/07, isolada na Eslovênia em 2007. A linhagem VI é composta exclusivamente por cepas animais detectadas em diversos países da Ásia e Europa. A linhagem VII engloba apenas a cepa VRLCU detectada em camelo no Egito em 2004. A cepa IAL-R2803 agrupa dentro da linhagem VIII, juntamente com uma única cepa humana (163) isolada no Vietnã em 2008 e outras cepas de origem bovina detectadas em continentes distintos (Figura 41).

A sequência de aminoácidos deduzida a partir da cepa IAL-R2803 foi determinada e comparada com as cepas de RVA G10 protótipos (Figura 42). A análise da sequência deduzida de aminoácidos entre a cepa IAL-R2803 e as demais cepas protótipos revelou um percentual de identidade variando de 86,4% a 98,9% (Figura 43). A cepa IAL-R2803 também apresentou a maior identidade de

aminoácidos com a cepa bovina DQ-75 (98,9%), isolada na China em 2008, seguido pelas cepas bovinas RVL-Bov3 (98,3%), RVL-Bov2 (98,3%), B11 (97,8%), VICG10.01 (97,2%), XJX-07 (97,8%) e MX001 (97,2%). A comparação entre a cepa IAL-R2803 com as demais cepas G10 de origem humana, revelou que a maior identidade de aminoácidos foi em relação a cepa 163 (96,7%), isolada no Vietnã em 2008, seguida pela cepa SI-R241/07 (96,1%), isolada na Eslovênia em 2007 (Figura 43). A cepa IAL-R2803 apresentou menor identidade de aminoácidos quando comparada à cepa de camelo VRLCU (86,4%) isolada no Egito em 2004 (Figura 43). Curiosamente, essa cepa G10 VRLCU detectada em camelo exibiu uma identidade de nucleotídeos maior (87,3%) do que a identidade de aminoácidos (86,4%) quando comparada à cepa IAL-R2803 (Figura 42, Figura 43).

A proteína VP7 da cepa IAL-R2803 possui um possível sítio de glicosilação N (aminoácido asparagina – Asn) localizado no aminoácido 69, o qual tende a ser conservado para todas as cepas de RVA (Figura 42). As regiões antigênicas da VP7 de A-D corroboram a classificação da cepa IAL-R2803 como genótipo G10. Vale ressaltar que o gene 9 da cepa IAL-R2803 foi sequenciado a partir do produto de PCR resultante da 2^o amplificação (*nested*), inviabilizando a visualização das regiões hipervariáveis E e F. Com exceção da região antigênica B, a cepa IAL-R2803 apresentou-se completamente idêntica as cepas de RVA de origem bovina RVL-Bov2, RVL-Bov3, DQ-75, B223, HUN-Z8 e MX001, as quais foram detectadas em países e períodos distintos (Figura 42). As regiões antigênicas C (entre aminoácidos 120 e 130) e D (entre aminoácidos 143 e 152) apresentam-se bastante conservadas em relação a todas as cepas analisadas, enquanto a região A (entre aminoácidos 39 e 50) apresenta-se mais variável (Figura 42).

O alinhamento da sequência de aminoácidos deduzida a partir do gene VP7 revelou que houve uma substituição única na cepa IAL-R2803 dentro da região hipervariável B (aminoácidos 87-101) na posição 91^{N→T}. Fora das regiões hipervariáveis, a cepa IAL-R2803 apresentou substituições nas posições 11^{I→V}, 19^{F→L} e 65^{AV→T} (Figura 42).

Embora os percentuais de similaridade de nucleotídeos e aminoácidos obtidos variem quando as diversas cepas de RVA G10 são comparadas entre si, a

árvore genealógica construída a partir da sequência deduzida de aminoácidos (Figura 44) permite observar que as relações genéticas entre a cepa IAL-R2803 e as demais cepas protótipos estão mantidas. A Figura 44 também evidencia os dois grupos geneticamente distintos, denominados neste estudo como E e F, da mesma forma que foram destacados na Figura 41. Entretanto, a árvore genealógica baseada em aminoácidos (Figura 44) também permite observar que as cepas caprinas LLR e Lamb-NT, detectadas na China, e a cepa humana R239, detectada no Brasil, formam um terceiro grupo geneticamente relacionado, denominado neste estudo como G. Essa relação filogenética não havia sido evidenciada na árvore de nucleotídeos da Figura 41. Em adição, a Figura 44 permite observar que as cepa humana SI-R241/07 e a cepa de camelo VRLCU agrupam dentro da Linhagem VIII. Essas duas cepas formavam as Linhagens V e VII, respectivamente, na árvore baseada em nucleotídeos (Figura 41).

	R2803	RVL-Bov2	Mc35	163	kol-679	VRLCU	6755	1784CI	6730	402	3008CM	mani-265	R239	DQ-75	RVL-Bov3	B11	VICG10.01	B223	HUN-28	CIT10A	XIX-07	B75	DK11311C	P343	61A	SI-R241	DijonA037	Erv2	E29TR	MX001	LLR	Lamb-NT	
R2803		93,6%	84,9%	93,4%	85,6%	87,3%	85,8%	86,0%	86,1%	86,1%	85,4%	84,8%	86,1%	94,6%	93,6%	93,4%	93,6%	92,4%	89,8%	90,6%	93,4%	90,6%	90,8%	89,8%	89,9%	89,9%	89,4%	85,4%	86,3%	92,9%	85,1%	84,6%	
RVL-Bov2			85,1%	96,0%	86,0%	88,4%	86,7%	86,8%	87,0%	86,0%	86,0%	84,2%	85,3%	95,8%	100,0%	96,0%	96,2%	96,3%	92,4%	93,7%	96,0%	93,6%	93,4%	92,7%	92,9%	91,3%	92,7%	85,6%	87,2%	95,3%	85,8%	85,3%	
Mc35				84,9%	89,9%	82,0%	88,7%	88,9%	88,7%	87,3%	87,3%	95,6%	84,4%	85,3%	85,1%	83,5%	84,4%	85,1%	83,9%	85,3%	85,6%	85,1%	84,9%	85,3%	85,8%	85,8%	85,3%	95,1%	89,1%	84,9%	86,5%	86,0%	
163					86,0%	88,0%	86,5%	87,0%	86,8%	86,1%	86,1%	84,6%	84,1%	94,9%	96,0%	96,5%	98,4%	95,6%	90,8%	92,5%	95,1%	92,5%	92,5%	91,8%	92,0%	91,1%	91,7%	84,8%	86,5%	94,6%	84,9%	84,4%	
kol-679						82,5%	96,2%	96,7%	96,5%	95,1%	92,0%	86,0%	85,6%	86,0%	84,9%	86,0%	86,0%	86,1%	86,5%	86,0%	86,1%	86,8%	85,8%	86,3%	86,8%	85,8%	86,7%	86,0%	89,6%	94,6%	86,5%	85,1%	84,6%
VRLCU							82,3%	82,3%	82,5%	81,8%	81,5%	81,6%	82,2%	88,6%	88,4%	87,9%	88,4%	87,9%	85,8%	87,5%	88,7%	87,0%	87,2%	87,5%	87,3%	86,7%	86,5%	81,5%	83,5%	88,0%	81,3%	80,8%	
6755								99,6%	99,6%	97,9%	98,6%	88,6%	85,4%	87,5%	86,7%	86,5%	86,8%	87,2%	86,1%	87,2%	87,5%	86,7%	87,2%	86,0%	86,1%	87,7%	86,1%	89,2%	96,3%	87,9%	84,9%	84,4%	
1784CI									99,8%	98,1%	98,4%	88,7%	85,6%	87,3%	86,8%	86,3%	87,3%	87,0%	86,3%	87,0%	87,3%	86,8%	87,3%	85,8%	86,0%	87,5%	86,3%	89,4%	96,5%	87,7%	85,1%	84,6%	
6730										98,2%	98,6%	88,6%	85,8%	87,5%	87,0%	86,5%	87,2%	87,2%	86,5%	87,2%	87,5%	87,0%	87,2%	86,0%	86,1%	87,7%	86,5%	89,2%	96,7%	87,9%	84,9%	84,4%	
402											96,8%	87,5%	85,1%	87,2%	86,0%	85,8%	86,8%	86,3%	85,4%	86,1%	86,8%	86,7%	86,1%	84,9%	85,1%	86,7%	85,4%	88,2%	95,3%	86,8%	84,2%	83,7%	
3008CM												87,2%	84,8%	86,5%	86,0%	85,8%	86,5%	86,1%	85,4%	86,1%	86,1%	86,0%	86,1%	84,9%	85,1%	87,0%	85,4%	87,9%	95,3%	86,8%	83,5%	83,0%	
mani-265													83,5%	84,6%	84,2%	82,9%	84,2%	84,4%	82,7%	85,1%	84,9%	84,8%	85,1%	84,4%	84,9%	83,9%	84,2%	92,0%	88,4%	84,4%	85,3%	84,8%	
R239														85,6%	85,3%	84,4%	84,9%	84,6%	84,2%	84,8%	85,3%	85,4%	85,1%	84,8%	84,9%	86,1%	84,9%	84,6%	85,8%	86,1%	86,8%	86,3%	
DQ-75															95,8%	95,6%	95,5%	95,6%	90,6%	92,4%	96,3%	91,7%	91,5%	91,3%	91,1%	90,8%	90,8%	85,8%	87,7%	94,8%	86,0%	85,4%	
RVL-Bov3																96,0%	96,2%	96,3%	92,4%	93,7%	96,0%	93,6%	93,4%	92,9%	91,3%	92,7%	85,6%	87,2%	95,3%	85,8%	85,3%		
B11																		96,7%	95,5%	91,1%	92,5%	95,8%	92,2%	92,4%	92,4%	91,8%	91,1%	91,3%	84,1%	86,3%	94,9%	83,9%	83,4%
VICG10.01																			95,5%	91,0%	92,7%	95,3%	92,7%	92,7%	91,7%	91,8%	91,3%	91,5%	84,6%	87,0%	94,8%	85,1%	84,6%
B223																				89,9%	92,7%	95,8%	92,9%	92,4%	92,9%	91,8%	91,5%	85,3%	87,7%	95,8%	85,1%	84,6%	
HUN-28																																	
CIT10A																																	
XIX-07																																	
B75																																	
DK11311C																																	
P343																																	
61A																																	
SI-R241																																	
DijonA037																																	
Erv2																																	
E29TR																																	
MX001																																	
LLR																																	
Lamb-NT																																	



Figura 40. Matriz de identidade das sequências nucleotídicas parciais do gene VP7 de RVA genótipo G10 gerada com o software *BioEdit* (Ibis Therapeutics, EUA). A cepa IAL-R2803 foi detectada em uma criança de 3 anos de idade apresentando gastroenterite aguda proveniente da cidade de Presidente Prudente, Estado de São Paulo (SP), Brasil. Sequências G10 de referência foram obtidas a partir do *GenBank*.

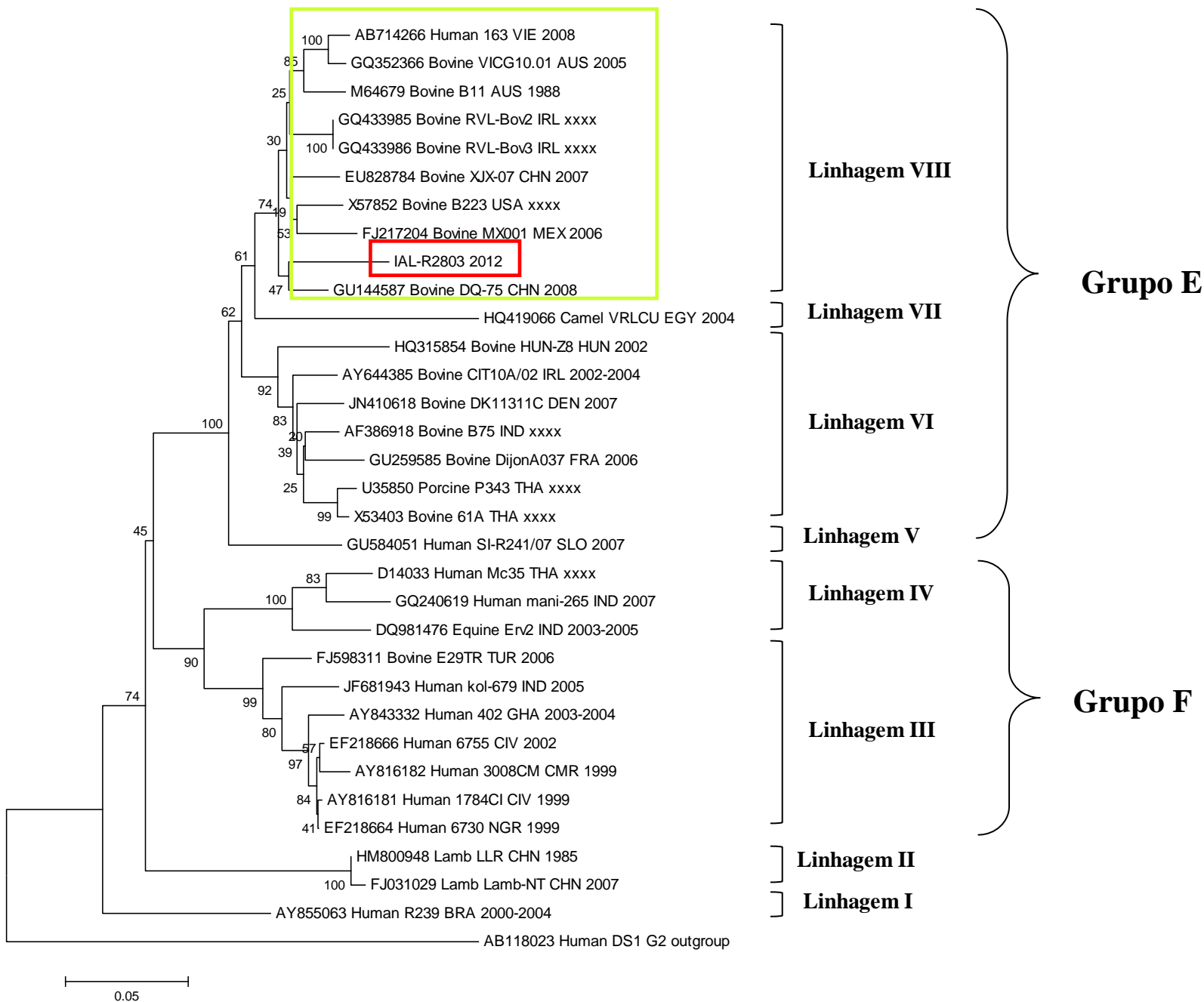


Figura 41. Árvore genealógica do tipo *Neighbor-Joining* (NJ) da sequência nucleotídica parcial do gene VP7 de RVA genótipo G10 da cepa IAL-R2803 (retângulo vermelho) gerada com o software MEGA 4.0. A cepa IAL-R2803 foi detectada em uma criança de 3 anos de idade apresentando gastroenterite aguda provenientes da cidade de Presidente Prudente, Estado de São Paulo (SP), Brasil. Sequências G10 de referência foram obtidas a partir do *GenBank*. O retângulo verde destaca as cepas de RVA com maior percentual de similaridade em relação à cepa IAL-R2638. E e F representam dois grupos geneticamente diferentes. Os números romanos de I a VIII representam 8 linhagens geneticamente distintas. As espécies e os números de acesso de cada cepa estão indicados. As siglas dos países de cada cepa estão descritas no Anexo 1. A escala indica a diversidade genética. Percentuais dos valores de *bootstrap* estão localizados nos nós dos ramos.



Figura 42. Alinhamento da sequência de aminoácidos deduzida a partir da sequência de nucleotídeos do gene VP7 entre a cepa G10 IAL-R2803 e as cepas protótipos. As regiões hipervariáveis A-D estão indicadas. O sítio de glicosilação N (aminoácidos 69) está indicado por asteriscos. As abreviações referentes aos aminoácidos estão listadas no Anexo 2.

	R2803	RVL-Bov2	Mc35	163	kol-679	VRLCU	6755	1784CI	6730	402	3008CM	mani-265	R239	DQ-75	RVL-Bov3	B11	VICG10.01	B223	HUN-28	CIT10A	XJX-07	B75	DK11311C	P343	61A	SI-R241	DijonA037	Erv2	E29TR	MX001	LLR	Lamb-NT			
R2803		98,3%	92,9%	96,7%	93,4%	86,4%	95,1%	95,1%	95,1%	93,4%	92,9%	90,2%	94,0%	98,9%	98,3%	97,8%	97,2%	96,7%	96,1%	95,6%	97,8%	96,7%	96,1%	94,5%	95,1%	96,1%	96,7%	94,5%	95,6%	97,2%	94,5%	92,9%			
RVL-Bov2			94,0%	97,2%	94,5%	87,5%	96,1%	96,1%	96,1%	94,5%	94,0%	91,3%	95,6%	98,9%	100,0%	98,3%	97,8%	97,8%	97,2%	96,7%	98,3%	97,2%	97,8%	95,6%	96,7%	97,8%	98,3%	95,6%	96,7%	97,8%	95,6%	92,3%	92,9%	91,3%	
Mc35				92,9%	95,1%	83,6%	95,6%	95,6%	95,6%	92,9%	93,4%	95,6%	91,3%	93,4%	94,0%	92,9%	93,4%	92,3%	92,9%	93,4%	93,4%	94,0%	94,0%	94,0%	94,0%	94,0%	94,5%	97,2%	95,1%	92,3%	92,9%	91,3%			
163					92,3%	85,8%	94,0%	94,0%	94,0%	92,3%	91,8%	90,2%	94,0%	96,7%	97,2%	97,8%	98,3%	95,6%	95,1%	94,5%	96,7%	95,6%	95,1%	93,4%	94,0%	96,1%	95,6%	94,5%	94,5%	96,1%	95,1%	93,4%			
kol-679						84,2%	98,3%	98,3%	98,3%	95,1%	96,1%	92,9%	91,3%	94,0%	94,5%	93,4%	94,0%	92,9%	93,4%	94,0%	93,4%	93,4%	93,4%	93,4%	93,4%	93,4%	94,5%	94,0%	94,5%	96,7%	92,9%	92,3%	90,7%		
VRLCU							85,3%	85,3%	85,3%	83,6%	83,6%	80,4%	83,6%	87,5%	87,5%	87,5%	86,9%	85,8%	86,9%	85,3%	86,9%	85,8%	85,8%	85,8%	85,3%	85,3%	86,4%	86,4%	84,7%	85,8%	86,4%	84,7%	83,1%		
6755								100,0%	100,0%	96,7%	97,8%	91,3%	92,9%	95,6%	96,1%	95,1%	95,6%	94,5%	95,1%	95,6%	95,1%	95,1%	95,1%	94,0%	94,0%	96,1%	95,6%	96,1%	98,3%	94,5%	94,0%	92,3%			
1784CI									100,0%	96,7%	97,8%	91,3%	92,9%	95,6%	96,1%	95,1%	95,6%	94,5%	95,1%	95,6%	95,1%	95,1%	95,1%	94,0%	94,0%	96,1%	95,6%	96,1%	98,3%	94,5%	94,0%	92,3%			
6730										96,7%	97,8%	91,3%	92,9%	95,6%	96,1%	95,1%	95,6%	94,5%	95,1%	95,6%	95,1%	95,1%	95,1%	94,0%	94,0%	96,1%	95,6%	96,1%	98,3%	94,5%	94,0%	92,3%			
402											94,5%	89,6%	91,3%	94,0%	94,5%	93,4%	94,0%	93,4%	92,9%	93,4%	93,4%	93,4%	93,4%	93,4%	92,3%	92,9%	94,5%	94,0%	94,5%	96,1%	92,9%	91,8%	90,2%		
3008CM												89,1%	90,7%	93,4%	94,0%	92,9%	93,4%	92,9%	93,4%	92,9%	93,4%	92,9%	92,9%	91,8%	91,8%	94,0%	93,4%	94,0%	96,1%	92,3%	92,3%	90,7%			
mani-265													88,5%	90,7%	91,3%	90,2%	90,7%	89,6%	89,6%	90,2%	90,7%	91,3%	91,3%	90,2%	91,8%	92,9%	90,7%	89,6%	90,2%	88,5%					
R239														94,5%	95,6%	94,0%	95,6%	93,4%	93,4%	93,4%	94,0%	94,5%	95,1%	92,9%	94,0%	95,6%	95,6%	92,9%	93,4%	93,4%	92,3%	90,7%			
DQ-75															98,9%	97,8%	97,2%	97,2%	96,7%	96,1%	97,8%	96,7%	96,7%	95,1%	95,6%	96,7%	97,2%	95,1%	96,1%	97,2%	95,1%	93,4%			
RVL-Bov3																98,3%	97,8%	97,2%	96,7%	98,3%	97,2%	97,8%	95,6%	96,7%	97,8%	98,3%	98,3%	95,6%	96,7%	97,8%	95,6%	94,0%			
B11																	98,3%	96,7%	96,1%	95,6%	98,9%	96,7%	96,1%	95,6%	95,1%	96,1%	96,7%	94,5%	95,6%	97,2%	94,5%	92,9%			
VICG10.01																		96,1%	96,1%	96,1%	97,2%	97,2%	96,7%	95,1%	95,6%	97,8%	97,2%	95,1%	96,1%	96,7%	95,1%	93,4%			
HUN-28																			95,6%	95,1%	96,7%	96,7%	95,1%	96,7%	95,1%	95,6%	96,1%	95,1%	95,6%	95,6%	94,5%	92,9%			
CIT10A																					95,6%	96,7%	95,6%	94,5%	94,5%	95,6%	96,1%	95,1%	95,1%	94,5%	92,9%				
XJX-07																						96,7%	96,7%	95,6%	94,5%	94,5%	95,6%	96,7%	94,5%	95,6%	97,2%	94,5%	92,9%		
B75																											98,3%	95,6%	96,1%	96,1%	97,8%	95,6%	96,1%	94,5%	92,9%
DK11311C																									95,6%	96,7%	98,3%	95,6%	95,6%	95,6%	94,5%	92,9%			
P343																												97,8%	94,5%	96,1%	94,5%	94,0%	93,4%	92,9%	
61A																												95,6%	97,2%	94,5%	94,5%	94,5%	93,4%	91,8%	
SI-R241																													98,3%	95,6%	96,7%	95,6%	94,5%	92,9%	
DijonA037																													96,1%	96,1%	96,1%	95,1%	93,4%		
Erv2																														96,7%	94,0%	94,5%	92,9%		
E29TR																															95,1%	94,5%	92,9%		
MX001																																94,0%	92,3%		
LLR																																	98,3%		
Lamb-NT																																			



Figura 43. Matriz de identidade das sequências deduzidas de aminoácidos a partir das sequências nucleotídicas parciais do gene VP7 de RVA genótipo G10 gerada com o software *BioEdit* (Ibis Therapeutics, EUA). A cepa IAL-R2803 foi detectada em uma criança de 3 anos de idade apresentando gastroenterite aguda proveniente da cidade de Presidente Prudente, Estado de São Paulo (SP), Brasil. Sequências G10 de referência foram obtidas a partir do *GenBank*.

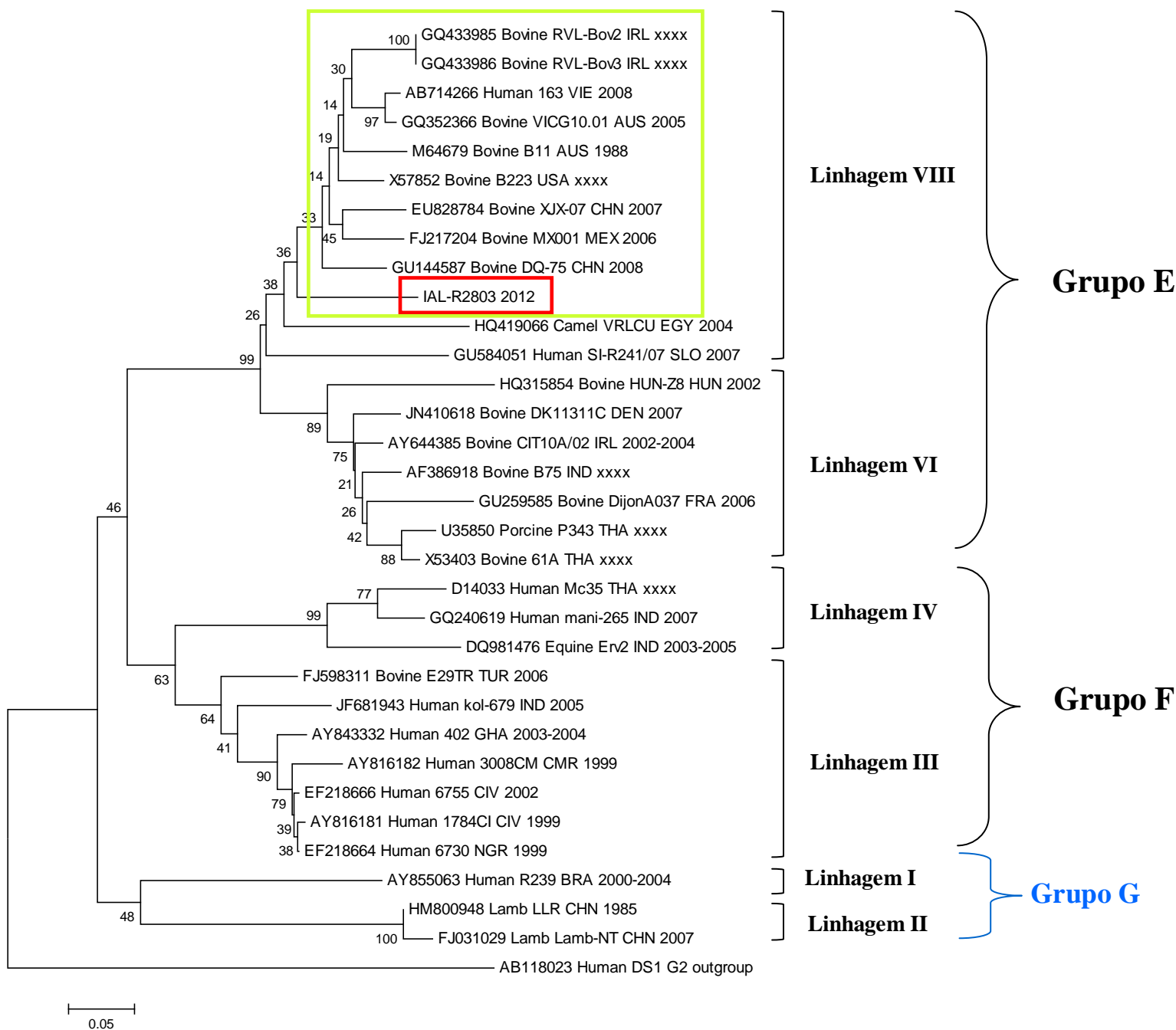


Figura 44. Árvore genealógica do tipo *Neighbor-Joining* (NJ) da sequência de aminoácidos deduzida a partir da sequência nucleotídica parcial do gene VP7 de RVA genótipo G10 da cepa IAL-R2803 (retângulo vermelho) gerada com o software MEGA 4.0. A cepa IAL-R2803 foi detectada em uma criança de 3 ano de idade apresentando gastroenterite aguda proveniente de cidade de Presidente Prudente, Estado de São Paulo (SP), Brasil. Sequências G10 de referência foram obtidas a partir do *GenBank*. O retângulo verde destaca as cepas de RVA com maior percentual de similaridade em relação a cepa IAL-R2803. E, F e G (destacado em azul) representam três grupos geneticamente diferentes. Os números romanos I-IV, VI e VIII representam linhagens geneticamente distintas. As espécies e os números de acesso de cada cepa estão indicados. As siglas dos países de cada cepa estão descritas no Anexo 1. A escala indica a diversidade proteica. Percentuais dos valores de *bootstrap* estão localizados nos nós dos ramos.

4.2 Rotavírus do grupo C

4.2.1 Triagem das amostras para rotavírus grupo C

RVC foi detectado em 15 (0,2%) do total de 6196 amostras coletadas de crianças, adultos e idosos no Brasil durante o período de 5 anos (Junho de 2007 a Junho de 2012) pela técnica de triagem EGPA. RVC foi detectado apenas nos anos de 2007 (0,1%; 1/746) e 2008 (1,5%; 14/954). Entre os anos de 2009 a 2012 não houve detecção de RVC. RVC foi detectado tanto em casos esporádicos quanto em surtos, acometendo adultos e crianças provenientes de cidades localizadas no interior dos Estados de São Paulo (SP) e de Goiás (GO). A média de idade dos pacientes acometidos foi de 16,9 anos e co-infecções com RVA não foram detectadas (Tabela 14).

Tabela 14. Dados sócios demográficos dos pacientes com gastroenterite aguda positivos para RVC detectados nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil durante a vigilância nacional dos RV no período compreendido entre Junho de 2007 e Junho de 2012.

Idade (Anos)	Sexo	Município	Estado	Mês/Ano	Caso	Cepa
2	M	Ipeúna	SP	Dezembro 2007	Esporádico	IAL-RC22
2	M	Catanduva	SP	Março 2008	Surto	IAL-RC09
7	M	Catanduva	SP	Março 2008	Surto	IAL-RC12
---	F	Santa Odela	SP	Março 2008	Esporádico	IAL-RC59
34	F	Capão Bonito	SP	Abril 2008	Esporádico	IAL-RC01
7	M	Sales	SP	Maio 2008	Surto	IAL-RC28
36	F	Sales	SP	Maio 2008	Surto	IAL-RC29
26	F	Sales	SP	Maio 2008	Surto	IAL-RC30
24	F	Sales	SP	Maio 2008	Surto	IAL-RC31
6	M	Salto	SP	Julho 2008	Surto	IAL-RC32
54	M	Santa Albertina	SP	Agosto 2008	Surto	IAL-RC33
26	M	Santa Albertina	SP	Agosto 2008	Surto	IAL-RC34
10	F	Pontalina	SP	Agosto 2008	Esporádico	IAL-RC35
1	F	Mauá	SP	Setembro 2008	Esporádico	IAL-RC36
1	F	Pirineus	GO	Setembro 2008	Surto	IAL-RC43

4.2.2 Amostras positivas para rotavírus grupo C previamente detectadas pelo NDE

O NDE realiza o diagnóstico diferencial para RV não pertencentes ao RVA desde 1980. Durante essa vigilância continuada por mais de 30 anos, o NDE detectou RVC em duas ocasiões anteriores: um caso esporádico em uma criança em 1988 (Timenetsky et al., 1993) e um surto na cidade de Valentim Gentil (SP) em 1993 (Souza et al., 1998). Essas amostras permaneceram estocadas em freezer - 70°C e foram incluídas na análise genética do RVC (Tabela 15).

Tabela 15. Dados sócios demográficos dos pacientes com gastroenterite aguda positivos para RVC previamente detectadas pelo NDE.

Idade (Anos)	Sexo	Município	Estado	Ano	Caso	Cepa	Referência Bibliográfica
---	---	São Paulo	SP	1988	Esporádico	IAL-RC76	Timenetsky et al., 1993
26	F	Valentim Gentil	SP	1993	Surto	IAL-RC23	Souza et al., 1998
13	F	Valentim Gentil	SP	1993	Surto	IAL-RC24	Souza et al., 1998
27	F	Valentim Gentil	SP	1993	Surto	IAL-RC25	Souza et al., 1998
7	F	Valentim Gentil	SP	1993	Surto	IAL-RC26	Souza et al., 1998
37	F	Valentim Gentil	SP	1993	Surto	IAL-RC27	Souza et al., 1998
14	M	Valentim Gentil	SP	1993	Surto	IAL-RC37	Souza et al., 1998
28	M	Valentim Gentil	SP	1993	Surto	IAL-RC60	Souza et al., 1998
25	F	Valentim Gentil	SP	1993	Surto	IAL-RC61	Souza et al., 1998

4.2.3 Reação de RT-PCR das amostras positivas para rotavírus grupo C

No total, 24 amostras positivas pra RVC foram analisadas pela técnica de RT-PCR ou *nested* RT-PCR, utilizando o *pool* de primers específicos para a caracterização molecular das proteínas VP6, VP7, VP4 e NSP4.

4.2.3.1 Proteína VP6 – Gene 5

Entre as 24 amostras positivas para RVC, 16 (66,7%) foram amplificadas e sequenciadas. A Tabela 16 apresenta as cepas de RVC amplificadas para a proteína VP6, suas respectivas denominações e números de acesso.

4.2.3.2 Proteína VP7 – Gene 8

Entre as 24 amostras de RVC, 19 (79,2%) foram amplificadas e sequenciadas. A Tabela 17 apresenta as cepas de RVC amplificadas para a proteína VP7, suas respectivas denominações e números de acesso.

4.2.3.3 Proteína VP4 – Gene 3

Entre as 24 amostras de RVC, 12 (50,0%) foram amplificadas e sequenciadas. A Tabela 18 apresenta as cepas de RVC amplificadas para a proteína VP4, suas respectivas denominações e números de acesso.

4.2.3.4 Proteína NSP4 – Gene 11

Entre as 24 amostras de RVC, 15 (62,5%) foram amplificadas e sequenciadas. A Tabela 19 apresenta as cepas de RVC amplificadas para a proteína NSP4, suas respectivas denominações e números de acesso.

Tabela 16. Cepas positivas para RVC amplificadas por RT-PCR ou *nested* RT-PCR e utilizadas na caracterização molecular da proteína VP6.

Cepa	RT-PCR (1ª amplificação)	<i>nested</i> RT-PCR (2ª amplificação)	Denominação	Número de acesso	Pares de base (pb)
IAL-RC01	+	+	Hu/Brazil/IAL-27/VP6/2008	JQ437389	301
IAL-RC09	+	+	SP09/Hu/BR/2008	HM853819	208
IAL-RC12	+	+	SP12/Hu/BR/2008	HM853820	208
IAL-RC22	+	+	SP22/Hu/BR/2007	HM853821	208
IAL-RC23	-	-	-	-	-
IAL-RC24	-	-	-	-	-
IAL-RC25	-	-	-	-	-
IAL-RC26	+	+	Hu/Brazil/IAL-RC26/VP6/1993	JQ513880	359
IAL-RC27	+	+	Hu/Brazil/IAL-RC27/VP6/1993	JQ513881	386
IAL-RC28	+	+	SP28/Hu/BR/2008	HM853822	208
IAL-RC29	+	+	Hu/Brazil/IAL-RC29/VP6/2008	JQ513873	207
IAL-RC30	+	+	Hu/Brazil/IAL-RC30/VP6/2008	JQ513874	303
IAL-RC31	+	+	Hu/Brazil/IAL-RC31/VP6/2008	JQ513875	249
IAL-RC32	-	-	-	-	-
IAL-RC33	+	+	Hu/Brazil/IAL-RC33/VP6/2008	JQ513876	314
IAL-RC34	+	+	Hu/Brazil/IAL-RC34/VP6/2008	JQ513877	301
IAL-RC35	+	+	SP35/Hu/BR/2008	HM853823	208
IAL-RC36	+	+	SP36/Hu/BR/2008	HM853824	208
IAL-RC37	-	-	-	-	-
IAL-RC43	-	-	-	-	-
IAL-RC59	+	NR*	Hu/Brazil/IAL-RC59/VP6/2008	JQ513878	281
IAL-RC60	-	-	-	-	-
IAL-RC61	-	-	-	-	-
IAL-RC76	-	+	Hu/Brazil/IAL-RC76/VP6/1988	JQ513879	326

NR* não realizado

Tabela 17. Cepas positivas para RVC amplificadas por RT-PCR ou *nested* RT-PCR e utilizadas na caracterização molecular da proteína VP7.

Cepa	RT-PCR (1ª amplificação)	<i>nested</i> RT-PCR (2ª amplificação)	Denominação	Número de acesso	Pares de base (pb)
IAL-RC01	-	+	RVC/Human-wt/BRA/IAL-RC01/2008	JX842684	288
IAL-RC09	+	NR*	RVC/Human-wt/BRA/IAL-RC09/2008	JX842685	446
IAL-RC12	+	NR*	RVC/Human-wt/BRA/IAL-RC12/2008	JX842686	439
IAL-RC22	+	NR*	RVC/Human-wt/BRA/IAL-RC22/2007	JX842687	532
IAL-RC23	-	-	-	-	-
IAL-RC24	+	NR*	RVC/Human-wt/BRA/IAL-RC24/1993	JX842688	364
IAL-RC25	-	-	-	-	-
IAL-RC26	+	NR*	RVC/Human-wt/BRA/IAL-RC26/1993	JX842689	412
IAL-RC27	-	+	RVC/Human-wt/BRA/IAL-RC27/1993	JX842690	285
IAL-RC28	-	-	-	-	-
IAL-RC29	+	NR*	RVC/Human-wt/BRA/IAL-RC29/2008	JX842691	442
IAL-RC30	+	NR*	RVC/Human-wt/BRA/IAL-RC30/2008	JX842692	493
IAL-RC31	+	NR*	RVC/Human-wt/BRA/IAL-RC31/2008	JX842693	356
IAL-RC32	+	NR*	RVC/Human-wt/BRA/IAL-RC32/2008	JX842694	398
IAL-RC33	+	NR*	RVC/Human-wt/BRA/IAL-RC33/2008	JX842695	324
IAL-RC34	+	NR*	RVC/Human-wt/BRA/IAL-RC34/2008	JX842696	393
IAL-RC35	+	NR*	RVC/Human-wt/BRA/IAL-RC35/2008	JX842697	426
IAL-RC36	+	NR*	RVC/Human-wt/BRA/IAL-RC36/2008	JX842698	399
IAL-RC37	-	+	RVC/Human-wt/BRA/IAL-RC37/1993	JX842699	221
IAL-RC43	-	+	RVC/Human-wt/BRA/IAL-RC43/2008	JX842700	286
IAL-RC59	+	NR*	RVC/Human-wt/BRA/IAL-RC59/2008	JX842701	427
IAL-RC60	-	-	-	-	-
IAL-RC61	-	-	-	-	-
IAL-RC76	+	NR*	RVC/Human-wt/BRA/IAL-RC76/1988	JX842702	476

NR* não realizado

Tabela 18. Cepas positivas para RVC amplificadas por RT-PCR e utilizadas na caracterização molecular da proteína VP4.

Cepa	RT-PCR	Denominação	Número de acesso	Pares de base (pb)
IAL-RC01	-	-	-	-
IAL-RC09	+	RVC/Human-wt/BRA/IAL-RC09/2008	JX842703	1022
IAL-RC12	+	RVC/Human-wt/BRA/IAL-RC12/2008	JX842704	911
IAL-RC22	+	RVC/Human-wt/BRA/IAL-RC22/2007	JX842705	687
IAL-RC23	-	-	-	-
IAL-RC24	-	-	-	-
IAL-RC25	-	-	-	-
IAL-RC26	+	RVC/Human-wt/BRA/IAL-RC26/1993	JX842706	970
IAL-RC27	+	RVC/Human-wt/BRA/IAL-RC27/1993	JX842707	938
IAL-RC28	-	-	-	-
IAL-RC29	-	-	-	-
IAL-RC30	+	RVC/Human-wt/BRA/IAL-RC30/2008	JX842708	898
IAL-RC31	+	RVC/Human-wt/BRA/IAL-RC31/2008	JX842709	874
IAL-RC32	+	-	-	-
IAL-RC33	+	RVC/Human-wt/BRA/IAL-RC33/2008	JX842710	959
IAL-RC34	+	RVC/Human-wt/BRA/IAL-RC34/2008	JX842711	851
IAL-RC35	+	-	-	-
IAL-RC36	+	RVC/Human-wt/BRA/IAL-RC36/2008	JX842712	911
IAL-RC37	-	-	-	-
IAL-RC43	+	RVC/Human-wt/BRA/IAL-RC36/2008	JX842713	1065
IAL-RC59	+	RVC/Human-wt/BRA/IAL-RC59/2008	JX842714	981
IAL-RC60	-	-	-	-
IAL-RC61	-	-	-	-
IAL-RC76	-	-	-	-

Tabela 19. Cepas positivas para RVC amplificadas por RT-PCR e utilizadas na caracterização molecular da proteína NSP4.

Cepa	RT-PCR	Denominação	Número de acesso	Pares de base (pb)
IAL-RC01	+	RVC/Human-wt/BRA/IAL-RC01/2008	JX857429	420
IAL-RC09	+	RVC/Human-wt/BRA/IAL-RC09/2008	JX857430	532
IAL-RC12	+	RVC/Human-wt/BRA/IAL-RC12/2008	JX857431	499
IAL-RC22	+	RVC/Human-wt/BRA/IAL-RC22/2007	JX857432	492
IAL-RC23	-	-	-	-
IAL-RC24	-	-	-	-
IAL-RC25	-	-	-	-
IAL-RC26	+	RVC/Human-wt/BRA/IAL-RC26/1993	JX857433	474
IAL-RC27	+	RVC/Human-wt/BRA/IAL-RC27/1993	JX857434	640
IAL-RC28	-	-	-	-
IAL-RC29	-	-	-	-
IAL-RC30	+	RVC/Human-wt/BRA/IAL-RC30/2008	JX857435	485
IAL-RC31	+	RVC/Human-wt/BRA/IAL-RC31/2008	JX857436	448
IAL-RC32	+	RVC/Human-wt/BRA/IAL-RC32/2008	JX857442	543
IAL-RC33	+	RVC/Human-wt/BRA/IAL-RC33/2008	JX863408	556
IAL-RC34	+	RVC/Human-wt/BRA/IAL-RC34/2008	JX857437	461
IAL-RC35	+	RVC/Human-wt/BRA/IAL-RC35/2008	JX857438	530
IAL-RC36	+	RVC/Human-wt/BRA/IAL-RC36/2008	JX857439	455
IAL-RC37	-	-	-	-
IAL-RC43	+	RVC/Human-wt/BRA/IAL-RC43/2008	JX857440	502
IAL-RC59	+	RVC/Human-wt/BRA/IAL-RC59/2008	JX857441	449
IAL-RC60	-	-	-	-
IAL-RC61	-	-	-	-
IAL-RC76	-	-	-	-

4.2.4 Sequenciamento genômico das amostras positivas para rotavírus do grupo C

4.2.4.1 Proteína VP6 – Gene 5

Os produtos das sequências de nucleotídeos obtidas para as cepas RVC VP6 foram de: 301pb (nucleotídeos 1053-1353) para a cepa IAL-RC01, 208pb (nucleotídeos 1105-1312) para a cepa IAL-RC09, 208pb (nucleotídeos 1105-1312) para a cepa IAL-RC12, 208pb (nucleotídeos 1105-1312) para a cepa IAL-RC22, 359pb (nucleotídeos 968-1326) para a cepa IAL-RC26, 386pb (nucleotídeos 968-1353) para a cepa IAL-RC27, 208pb (nucleotídeos 1105-1312) para a cepa IAL-RC28, 207pb (nucleotídeos 1147-1353) para a cepa IAL-RC29, 303pb (nucleotídeos 1051-1353) para a cepa IAL-RC30, 249pb (nucleotídeos 1105-1353) para a cepa IAL-RC31, 314pb (nucleotídeos 1040-1353) para a cepa IAL-RC33, 301pb (nucleotídeos 1053-1353) para a cepa IAL-RC34, 208pb (nucleotídeos 1105-1312) para a cepa IAL-RC35, 208pb (nucleotídeos 1105-1312) para a cepa IAL-RC36, 281pb (nucleotídeos 1067-1347) para a cepa IAL-RC59 e 326pb (nucleotídeos 999-1324) para a cepa IAL-RC76. Para as análises de identidade, comparação com as cepas protótipos e construção da árvore genealógica foram utilizadas sequências com 208pb.

As cepas VP6 IAL-RC apresentaram identidade nucleotídica de 96,1-100% quando comparadas entre si. A análise genética das sequências parciais do gene VP6 permitiu observar que as cepas humanas IAL-RC detectadas em 2007-2008 (IAL-RC01, IAL-RC09, IAL-RC12, IAL-RC22, IAL-RC28-31, IAL-RC33-36 e IAL-RC59) exibem alta similaridade nucleotídica com cepas humanas asiáticas (Y09-1, Y08-3, BK0830 e YNR001) isoladas no Japão e na China entre 2007 e 2009 (99-100%) (Figura 45). Por outro lado, as cepas humanas IAL-RC26 e IAL-RC27 detectadas em 1993, exibem maior identidade nucleotídica com as cepas humanas protótipo Bristol (98,5-99%) e Preston (98,5-99%), identificadas no Reino Unido na década de 80 e com as cepas humanas brasileiras PA24006-35B/84 (97,5-98%) e

PA24002-75R/85 (97,5-98%) detectadas em Belém do Pará (PA) em 1984 e 1985 (Figura 45).

A cepa humana IAL-RC76, detectada em 1988, apresenta maior identidade nucleotídica com cepas humanas brasileiras (9782, 8392, 8346, 6325, 1154 e 1006) (98%), japonesas (Y06-1) (98%), indianas (V508) (98%), eslovenas (SI-716/03) (97,5%), chinesas (208) (97,5%), sul-coreanas (CAU 10-312) (97,1%) e de Bangladesh (DhakaC2 e BS347) (97,1%), detectadas entre 1994 e 2010 (98%) (Figura 45). O percentual de identidade compartilhado entre as cepas IAL-RC e as demais cepas humanas fica evidente na Figura 46.

A análise genética indicou que as cepas VP6 IAL-RC pertencem à linhagem humana e nenhuma delas está relacionada com cepas de origem animal (Figura 45, Figura 46). Todas as cepas RVC humanas, incluindo aquelas analisadas neste estudo, agruparam em um único genótipo, I2. Essa denominação foi provisoriamente proposta por Yamamoto et al. (2011), seguindo a nomenclatura utilizada para designar os genótipos de RVA (Mathijnsens et al., 2008b). A cepa porcina Cowden e a bovina Shintoku foram identificadas como I1 e I3, respectivamente (Figura 46). A Figura 46 também permite observar que as cepas RVC analisadas estão divididas em dois grupos geneticamente diferentes, denominados nesse estudo H e I. O grupo H é composto exclusivamente por cepas humanas, enquanto o grupo I possui cepas de origem animal e humana.

A comparação das sequências parciais do gene 5 (VP6) entre as cepas IAL-RC e as demais cepas humanas retiradas do *GenBank* evidenciou um percentual de similaridade de 96,1% a 100% (Figura 45, Figura 46). Exceção se faz entre as cepas detectadas neste estudo e as cepas humanas PA24183-48 (EF635993), PA24042-78 (EF635992), PA24006-13 (EF635981) e PA24006-34 (EF635985), detectadas em Belém do Pará (PA), as quais exibem um percentual de similaridade de 80,7-83,6% (Figura 45, Figura 46).

As cepas IAL-RC apresentaram identidade genética menor quando comparadas com cepas de RVC detectadas em animais, incluindo cepas de origem bovina (79,8-84,6%) e suína (78,8-86%). Quando as cepas RVC bovinas foram comparadas entre si, as percentagens de identidade variaram de 87% a 99%. A

identidade de nucleotídeos encontrada entre as cepas de RVC de origem suína foi de 86,5-97,5% (Figura 45, Figura 46).

Um alto percentual de identidade foi observado entre as cepas de RVC de origem humana detectadas em Belém do Pará (PA24183-48, PA24042-78, PA24006-13 e PA24006-34) e a cepa porcina Cowden (M941557) (99,5%). A análise genética também evidenciou uma similaridade nucleotídica entre estas cepas humanas brasileiras e a cepa bovina WD534tc (AF162434) (97,5%). Um alto percentual de similaridade também é compartilhado entre a cepa porcina Cowden e a cepa bovina WD534tc (98%) (Figura 45). O alto percentual de identidade compartilhado entre as cepas humanas provenientes de Belém do Pará, a cepa porcina Cowden e a cepa bovina WD534tc fica evidente na Figura 46.

A sequência de aminoácidos deduzida a partir das cepas IAL-RC01, IAL-RC09, IAL-RC12, IAL-RC22, IAL-RC26-31, IAL-RC33-36, IAL-RC59 e IAL-RC76 foi determinada e comparada com as cepas de RVC VP6 protótipos (Figura 47). A proteína VP6 dos RVC possui sete regiões altamente conservadas denominadas I-VII (aminoácidos 1-10, 46-56, 66-78, 95-113, 123-140, 198-206, e 245-254) (Jiang et al., 1992). O gene 5 dos RVC é formado por 1353 nucleotídeos com uma ORF de 1185 nucleotídeos (395 aminoácidos). As regiões 5' e 3' não codificadoras apresentam 22 e 146 nucleotídeos, respectivamente (Cooke et al., 1992). Vale ressaltar, que os três primers utilizados na reação de sequenciamento (C1, C3 e C4) foram desenhados com base na porção 3' terminal conservada (nucleotídeos 994-1349) da proteína VP6, impossibilitando a análise comparativa das cepas humanas IAL-RC nas regiões conservadas do gene (I-VII).

A sequência de 51 aminoácidos deduzidos localizados na região codificadora do gene VP6 (344-395 aa) das nossas amostras de RVC foram idênticas as outras cepas humanas analisadas, exceto pela cepa humana brasileira PA24006-35BR/84 (V→A na posição 394) e pelas cepas humanas brasileiras semelhantes a suíno PA24183-48BR/85, PA24042-78BR/86, PA24006-34BR/84 e PA24006-13BR/83 (H→Q na posição 368 e I→V na posição 387). Essas sequências de cepas humanas de RVC diferem das cepas bovinas e suínas, incluindo as cepas humanas brasileiras semelhantes a suíno, em duas posições:

368^{H→Q} e 387^{I→V}. A isoleucina (I) situada na posição 287 das cepas humanas IAL-RC26 e IAL-RC27 foi substituída por uma valina (V). De modo interessante, a mesma substituição também é observada nas cepas de origem animal (porcina e bovina) e nas cepas humanas brasileiras semelhantes a suíno (Figura 47).

A análise da sequência deduzida de aminoácidos entre as cepas IAL-RC01, IAL-RC09, IAL-RC12, IAL-RC22, IAL-RC26-31, IAL-RC33-36, IAL-RC59 e IAL-RC76 e as demais cepas humanas protótipos revelou um percentual de identidade variando de 58,4% a 100%. As cepas detectadas neste estudo e as cepas humanas PA24183-48 (EF635993), PA24042-78 (EF635992), PA24006-13 (EF635981) e PA24006-34 (EF635985), detectadas em Belém do Pará (PA) são as que exibem menor percentual de similaridade de aminoácidos entre si (58,4-64,6%) (Figura 48). Em relação às cepas bovinas e porcinas o percentual de identidade variou de 53,8-67,6% e 56,9-66,1%, respectivamente (Figura 48).

As cepas VP6 IAL-RC apresentaram identidade de aminoácidos de 89,3-100% quando comparadas entre si. As cepas humanas IAL-RC detectadas em 2007-2008 (IAL-RC01, IAL-RC09, IAL-RC12, IAL-RC22, IAL-RC28-31, IAL-RC33-36 e IAL-RC59) exibem alta similaridade de aminoácidos com cepas humanas asiáticas (Y09-1, Y08-3, BK0830 e YNR001) isoladas no Japão e na China entre 2007 e 2009 (98,4-100%) (Figura 48). Por outro lado, as cepas humanas IAL-RC26 e IAL-RC27 detectadas em 1993, exibem maior identidade de aminoácidos com a cepa humana protótipo Bristol (96,9-98,4%) isolada no Reino Unido na década de 80 (Figura 48).

A cepa humana IAL-RC76, detectada em 1988, apresenta maior identidade de aminoácidos com cepas humanas brasileiras (9782, 8392, 8346, 6325, 1154 e 1006) (96,9%), japonesas (Y06-1) (96,9%), indianas (V508) (96,9%) e do Reino Unido (Bristol) (96,9%) (Figura 48). A árvore genealógica construída a partir da sequência deduzida de aminoácidos (Figura 49) permite observar que as relações genéticas entre as cepas IAL-RC01, IAL-RC09, IAL-RC12, IAL-RC22, IAL-RC26-31, IAL-RC33-36, IAL-RC59 e IAL-RC76 e as demais cepas protótipos estão mantidas. A Figura 49 também evidencia os dois grupos geneticamente distintos, denominados neste estudo como H e I, da mesma forma que foram destacados na

Figura 46.

10006	1154	6325	8346	8392	9782	24183-48	24042-78	24006-34	24006-35	24006-13	24099-49	24002-75	Dhaka2	SI-716	Moduga	Jajeri	Preston	Belem	CAU10	Icheon	OKB830	OH567	YNR001	BS347	GUP188	Y09-1	Y08-3	Y06-1	CMH004	Z08	BCN9	82/05	1394	V508	Bristol	Wu82					
99,0%	99,0%	99,0%	99,0%	99,0%	99,0%	81,7%	81,7%	81,7%	96,6%	81,7%	98,5%	97,1%	98,0%	98,5%	98,0%	98,0%	97,5%	98,0%	98,0%	99,0%	100,0%	98,5%	100,0%	98,0%	99,0%	100,0%	100,0%	98,0%	99,5%	98,5%	98,0%	98,5%	98,5%	99,0%	97,5%	98,0%	99,0%	97,5%	98,0%		
99,0%	99,0%	99,0%	99,0%	99,0%	99,0%	81,7%	81,7%	81,7%	96,6%	81,7%	98,5%	97,1%	98,0%	98,5%	98,0%	98,0%	98,0%	97,5%	98,0%	98,0%	99,0%	100,0%	98,5%	100,0%	98,0%	99,0%	100,0%	100,0%	98,0%	99,5%	98,5%	98,0%	98,5%	98,5%	99,0%	97,5%	98,0%	99,0%	97,5%	98,0%	
99,0%	99,0%	99,0%	99,0%	99,0%	99,0%	81,7%	81,7%	81,7%	96,6%	81,7%	98,5%	97,1%	98,0%	98,5%	98,0%	98,0%	98,0%	97,5%	98,0%	98,0%	99,0%	100,0%	98,5%	100,0%	98,0%	99,0%	100,0%	100,0%	98,0%	99,5%	98,5%	98,0%	98,5%	98,5%	99,0%	97,5%	98,0%	99,0%	97,5%	98,0%	
99,0%	99,0%	99,0%	99,0%	99,0%	99,0%	81,7%	81,7%	81,7%	96,6%	81,7%	98,5%	97,1%	98,0%	98,5%	98,0%	98,0%	98,0%	97,5%	98,0%	98,0%	99,0%	100,0%	98,5%	100,0%	98,0%	99,0%	100,0%	100,0%	98,0%	99,5%	98,5%	98,0%	98,5%	98,5%	99,0%	97,5%	98,0%	99,0%	97,5%	98,0%	
99,0%	99,0%	99,0%	99,0%	99,0%	99,0%	81,7%	81,7%	81,7%	96,6%	81,7%	98,5%	97,1%	98,0%	98,5%	98,0%	98,0%	98,0%	97,5%	98,0%	98,0%	99,0%	100,0%	98,5%	100,0%	98,0%	99,0%	100,0%	100,0%	98,0%	99,5%	98,5%	98,0%	98,5%	98,5%	99,0%	97,5%	98,0%	99,0%	97,5%	98,0%	
98,0%	98,0%	98,0%	98,0%	98,0%	98,0%	83,6%	83,6%	83,6%	96,6%	83,6%	96,6%	97,1%	97,1%	97,1%	97,1%	96,1%	97,1%	97,1%	98,5%	96,1%	97,1%	97,1%	97,1%	96,6%	97,1%	97,1%	97,1%	97,1%	97,1%	97,1%	97,1%	97,1%	97,1%	97,1%	97,1%	96,6%	96,6%	98,0%	98,5%	97,1%	
98,5%	98,5%	98,5%	98,5%	98,5%	98,5%	83,6%	83,6%	83,6%	96,6%	83,6%	97,5%	97,5%	97,5%	97,5%	97,5%	97,5%	97,5%	97,5%	97,5%	97,5%	97,5%	97,5%	97,5%	97,5%	97,5%	97,5%	97,5%	97,5%	97,5%	97,5%	97,5%	97,5%	97,5%	97,5%	97,5%	97,5%	97,5%	97,5%	97,5%	97,5%	
99,0%	99,0%	99,0%	99,0%	99,0%	99,0%	81,7%	81,7%	81,7%	96,6%	81,7%	98,5%	97,1%	98,0%	98,5%	98,0%	98,0%	98,0%	97,5%	98,0%	98,0%	99,0%	100,0%	98,5%	100,0%	98,0%	99,0%	100,0%	100,0%	98,0%	99,5%	98,5%	98,0%	98,5%	98,5%	99,0%	97,5%	98,0%	99,0%	97,5%	98,0%	
98,0%	98,0%	98,0%	98,0%	98,0%	98,0%	80,7%	80,7%	80,7%	95,6%	80,7%	97,5%	96,1%	97,1%	97,1%	96,6%	97,1%	97,1%	96,6%	97,1%	97,1%	98,0%	99,0%	97,5%	99,0%	97,5%	99,0%	97,5%	99,0%	97,5%	99,0%	97,5%	99,0%	97,5%	99,0%	97,5%	97,5%	97,5%	98,0%	96,6%	97,1%	
99,0%	99,0%	99,0%	99,0%	99,0%	99,0%	81,7%	81,7%	81,7%	96,6%	81,7%	98,5%	97,1%	98,0%	98,5%	98,0%	98,0%	98,0%	97,5%	98,0%	98,0%	99,0%	100,0%	98,5%	100,0%	98,0%	99,0%	100,0%	100,0%	98,0%	99,5%	98,5%	98,0%	98,5%	98,5%	99,0%	97,5%	98,0%	99,0%	97,5%	98,0%	
99,0%	99,0%	99,0%	99,0%	99,0%	99,0%	81,7%	81,7%	81,7%	96,6%	81,7%	98,5%	97,1%	98,0%	98,5%	98,0%	98,0%	98,0%	97,5%	98,0%	98,0%	99,0%	100,0%	98,5%	100,0%	98,0%	99,0%	100,0%	100,0%	98,0%	99,5%	98,5%	98,0%	98,5%	98,5%	99,0%	97,5%	98,0%	99,0%	97,5%	98,0%	
98,5%	98,5%	98,5%	98,5%	98,5%	98,5%	81,2%	81,2%	81,2%	96,1%	81,2%	98,5%	97,1%	98,0%	98,5%	98,0%	98,0%	98,0%	97,5%	98,0%	98,0%	99,0%	100,0%	98,5%	100,0%	98,0%	99,0%	100,0%	100,0%	98,0%	99,5%	98,5%	98,0%	98,5%	98,5%	99,0%	97,5%	98,0%	99,0%	97,5%	98,0%	
84,6%	84,6%	84,6%	84,6%	84,6%	84,6%	89,9%	89,9%	89,9%	83,6%	89,9%	83,6%	84,1%	84,6%	84,1%	84,1%	85,0%	84,6%	85,5%	85,0%	83,6%	83,6%	83,1%	83,6%	85,0%	83,6%	85,0%	83,6%	83,6%	83,6%	84,6%	84,1%	84,1%	85,0%	83,6%	83,6%	84,6%	85,5%	84,1%	84,6%	84,1%	84,1%
84,6%	84,6%	84,6%	84,6%	84,6%	84,6%	89,9%	89,9%	89,9%	83,6%	89,9%	83,6%	84,1%	84,6%	84,1%	84,1%	85,0%	84,6%	85,5%	85,0%	83,6%	83,6%	83,1%	83,6%	85,0%	83,6%	85,0%	83,6%	83,6%	84,6%	84,1%	84,1%	85,0%	83,6%	83,6%	84,6%	85,5%	84,1%	84,6%	84,1%	84,1%	
83,1%	83,1%	83,1%	83,1%	83,1%	83,1%	88,9%	88,9%	88,9%	81,2%	88,9%	82,2%	81,7%	83,1%	82,6%	82,6%	83,6%	82,2%	83,1%	83,6%	82,2%	82,2%	81,7%	82,2%	83,6%	82,2%	82,2%	82,2%	82,2%	82,2%	82,2%	82,2%	82,2%	82,2%	82,6%	82,6%	83,1%	82,2%	83,1%	83,1%	82,6%	
81,2%	81,2%	81,2%	81,2%	81,2%	81,2%	97,5%	97,5%	97,5%	80,2%	97,5%	80,7%	80,7%	81,2%	80,7%	81,2%	81,2%	81,2%	80,7%	81,2%	80,7%	81,2%	80,7%	81,2%	80,7%	81,2%	80,7%	81,2%	80,7%	81,2%	80,7%	81,2%	80,7%	81,2%	80,7%	81,2%	80,7%	81,2%	82,2%	81,2%	82,6%	
84,1%	84,1%	84,1%	84,1%	84,1%	84,1%	88,4%	88,4%	88,4%	83,1%	88,4%	83,1%	83,6%	84,1%	83,6%	83,6%	84,6%	84,1%	85,0%	84,6%	83,1%	83,1%	82,6%	83,1%	84,6%	83,1%	83,1%	83,1%	84,1%	83,6%	83,6%	84,6%	83,1%	83,1%	84,6%	84,6%	83,1%	84,1%	85,0%	83,6%		
83,1%	83,1%	83,1%	83,1%	83,1%	83,1%	93,7%	93,7%	93,7%	82,2%	93,7%	82,2%	82,6%	83,1%	82,6%	82,6%	83,6%	82,2%	83,6%	82,2%	82,6%	82,2%	83,1%	82,6%	82,2%	83,6%	82,2%	82,2%	84,1%	82,6%	83,6%	82,6%	82,2%	84,1%	85,5%	84,6%	83,6%	83,6%	85,0%	84,6%	84,6%	
83,1%	83,1%	83,1%	83,1%	83,1%	83,1%	96,1%	96,1%	96,1%	82,2%	96,1%	82,2%	82,6%	83,1%	82,6%	82,6%	83,6%	82,2%	83,6%	82,2%	82,2%	82,2%	82,2%	82,6%	82,2%	83,6%	82,2%	82,2%	84,1%	82,6%	83,6%	82,6%	82,2%	84,1%	85,5%	84,6%	83,6%	83,6%	85,0%	84,6%	84,6%	
85,0%	85,0%	85,0%	85,0%	85,0%	85,0%	89,4%	89,4%	89,4%	84,1%	89,4%	84,1%	84,6%	84,6%	84,6%	85,5%	85,0%	85,0%	84,6%	84,1%	83,6%	84,1%	83,6%	84,1%	83,6%	84,1%	83,6%	84,1%	83,6%	83,6%	83,6%	85,5%	84,6%	83,6%	83,6%	85,0%	84,6%	84,6%	85,5%	84,1%	84,6%	
80,7%	80,7%	80,7%	80,7%	80,7%	80,7%	90,3%	90,3%	90,3%	79,8%	90,3%	79,8%	80,2%	80,7%	80,2%	80,2%	80,7%	81,2%	80,7%	81,2%	79,8%	79,8%	80,2%	79,8%	81,2%	79,8%	79,8%	80,2%	80,2%	80,2%	79,8%	80,2%	79,8%	80,2%	79,8%	80,2%	79,8%	80,7%	81,7%	80,2%		
84,6%	84,6%	84,6%	84,6%	84,6%	84,6%	97,1%	97,1%	97,1%	83,6%	97,1%	83,6%	84,1%	84,6%	84,1%	84,1%	85,0%	84,6%	83,6%	85,0%	83,6%	83,6%	84,1%	83,6%	85,0%	83,6%	85,0%	83,6%	83,6%	84,6%	84,1%	84,1%	85,0%	84,1%	84,1%	83,6%	83,6%	84,6%	85,5%	84,1%	84,6%	
81,7%	81,7%	81,7%	81,7%	81,7%	81,7%	87,9%	87,9%	87,9%	80,7%	87,9%	80,7%	81,2%	81,7%	81,2%	81,2%	82,2%	81,7%	81,7%	82,2%	80,7%	80,7%	80,2%	80,7%	82,2%	80,7%	80,2%	80,7%	81,7%	81,2%	81,2%	81,2%	81,2%	81,2%	81,2%	80,7%	80,7%	81,7%	82,6%	81,2%		
81,7%	81,7%	81,7%	81,7%	81,7%	81,7%	93,2%	93,2%	93,2%	80,7%	93,2%	80,7%	81,2%	81,7%	81,2%	81,2%	82,2%	81,7%	80,7%	82,2%	80,7%	80,7%	81,2%	80,7%	81,2%	80,7%	81,2%	80,7%	81,2%	80,7%	81,2%	80,7%	81,2%	80,7%	81,2%	80,7%	81,7%	82,6%	81,2%	81,7%	82,6%	
81,2%	81,2%	81,2%	81,2%	81,2%	81,2%	89,9%	89,9%	89,9%	80,2%	89,9%	80,2%	80,7%	81,2%	80,7%	80,7%	81,2%	81,2%	81,2%	81,7%	80,2%	80,2%	79,8%	80,2%	81,7%	80,2%	80,2%	81,2%	80,7%	80,7%	80,2%	81,2%	80,7%	80,2%	81,2%	80,2%	81,2%	82,2%	80,7%	81,2%	82,6%	
83,1%	83,1%	83,1%	83,1%	83,1%	83,1%	95,5%	95,5%	95,5%	82,2%	95,5%	82,2%	82,6%	83,1%	82,6%	82,6%	83,6%	82,2%	83,6%	82,2%	82,2%	82,2%	82,2%	82,6%	82,2%	83,6%	82,2%	82,2%	84,1%	82,6%	83,6%	82,6%	82,2%	84,1%	85,5%	84,6%	83,6%	83,6%	85,0%	84,6%	84,6%	
83,6%	83,6%	83,6%	83,6%	83,6%	83,6%	89,9%	89,9%	89,9%	81,7%	89,9%	82,6%	82,2%	83,6%	83,1%	83,1%	82,6%	84,1%	82,6%	83,6%	82,2%	82,6%	82,2%	82,6%	82,2%	83,6%	82,2%	82,2%	84,1%	82,6%	83,6%	82,6%	82,2%	84,1%	85,5%	84,6%	83,6%	83,6%	85,0%	84,6%	84,6%	
84,1%	84,1%	84,1%	84,1%	84,1%	84,1%	89,9%	89,9%	89,9%	82,2%	89,9%	83,1%	82,6%	84,1%	83,6%	82,6%	83,6%	83,1%	82,2%	84,6%	83,1%	83,1%	83,6%	84,1%	83,6%	83,1%	83,6%	84,1%	83,1%	83,1%	83,1%	83,1%	83,1%	83,1%	83,1%	84,1%	84,1%	84,1%	83,6%	83,6%		
83,1%	83,1%	83,1%	83,1%	83,1%	83,1%	90,8%	90,8%	90,8%	82,2%	90,8%	82,2%	82,6%	83,1%	82,6%	82,6%	83,6%	83,1%	82,6%	84,1%	82,2%	82,2%	82,2%	82,6%	82,2%	83,6%	82,2%	82,2%	84,1%	82,6%	83,6%	82,6%	82,2%	84,1%	85,5%	84,6%	83,6%	83,6%	85,0%	84,6%	84,6%	
	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	82,6%	82,6%	82,6%	97,5%	82,6%	98,5%	98,0%	99,0%	99,5%	98,0%	99,0%	98,5%	98,0%	99,0%	99,0%	99,0%	99,0%	98,5%	99,0%	99,0%	99,0%	99,0%	99,0%	99,0%	99,5%	99,5%	99,0%	98,5%	98,5%	100,0%	98,5%	98,5%	98,0%	98,0%		
		100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	82,6%	82,6%	82,6%	97,5%	82,6%	98,5%	98,0%	99,0%	99,5%	98,0%	99,0%	98,5%	98,0%	99,0%	99,0%	99,0%	99,0%	98,5%	99,0%	99,0%	99,0%	99,0%	99,0%	99,0%	99,5%	99,5%	99,0%	98,5%	98,5%	100,0%	98,5%	98,5%	98,0%	98,0%		
			100,0%	100,0%	100,0%	82,6%	82,6%	82,6%	97,5%	82,6%	98,5%	98,0%	99,0%	99,5%	98,0%	99,0%	98,5%	98,0%	99,0%	99,0%	99,0%	99,0%	98,5%	99,0%	99,0%	99,0%	99,0%	99,0%	99,0%	99,5%	99,5%	99,0%	98,5%	98,5%	100,0%	98,5%	98,5%	98,0%	98,0%		
				100,0%	100,0%	82,6%	82,6%</																																		

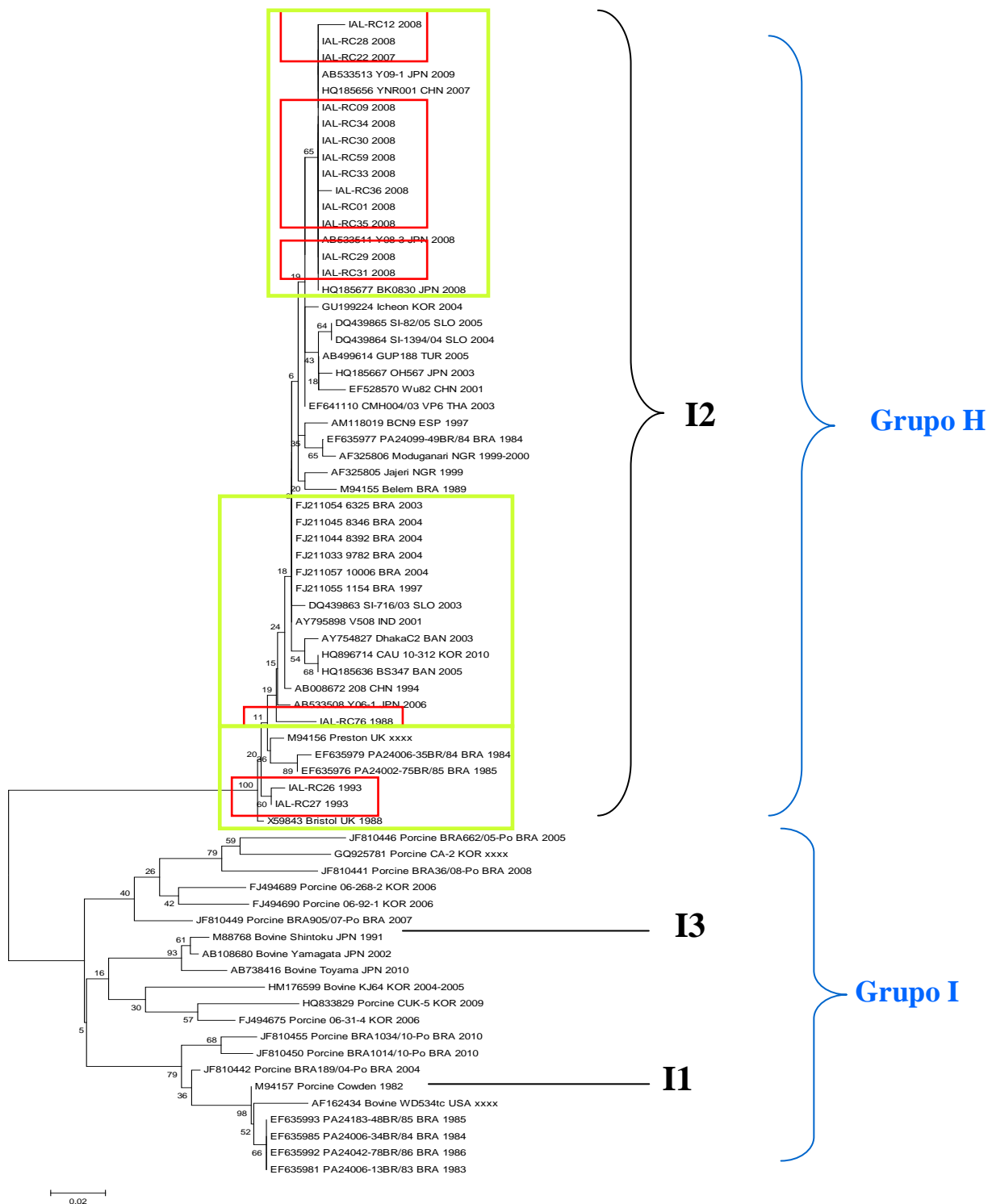
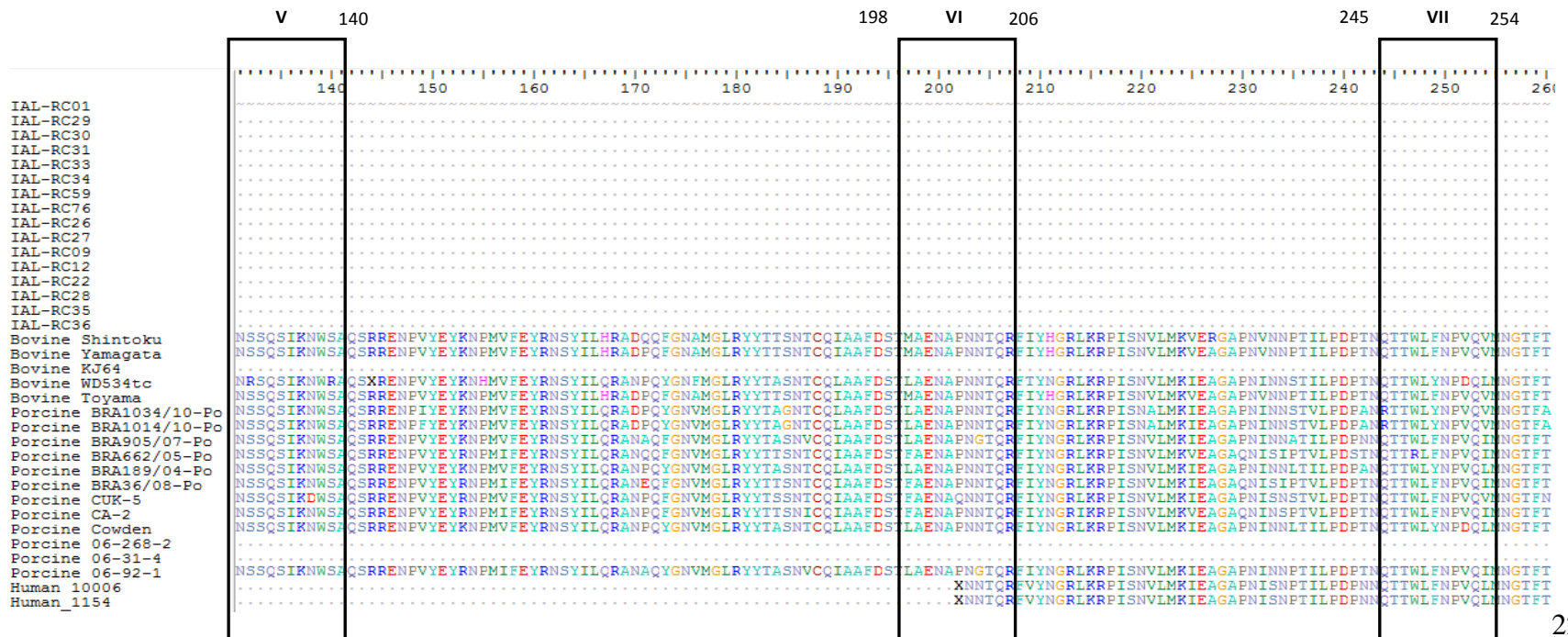
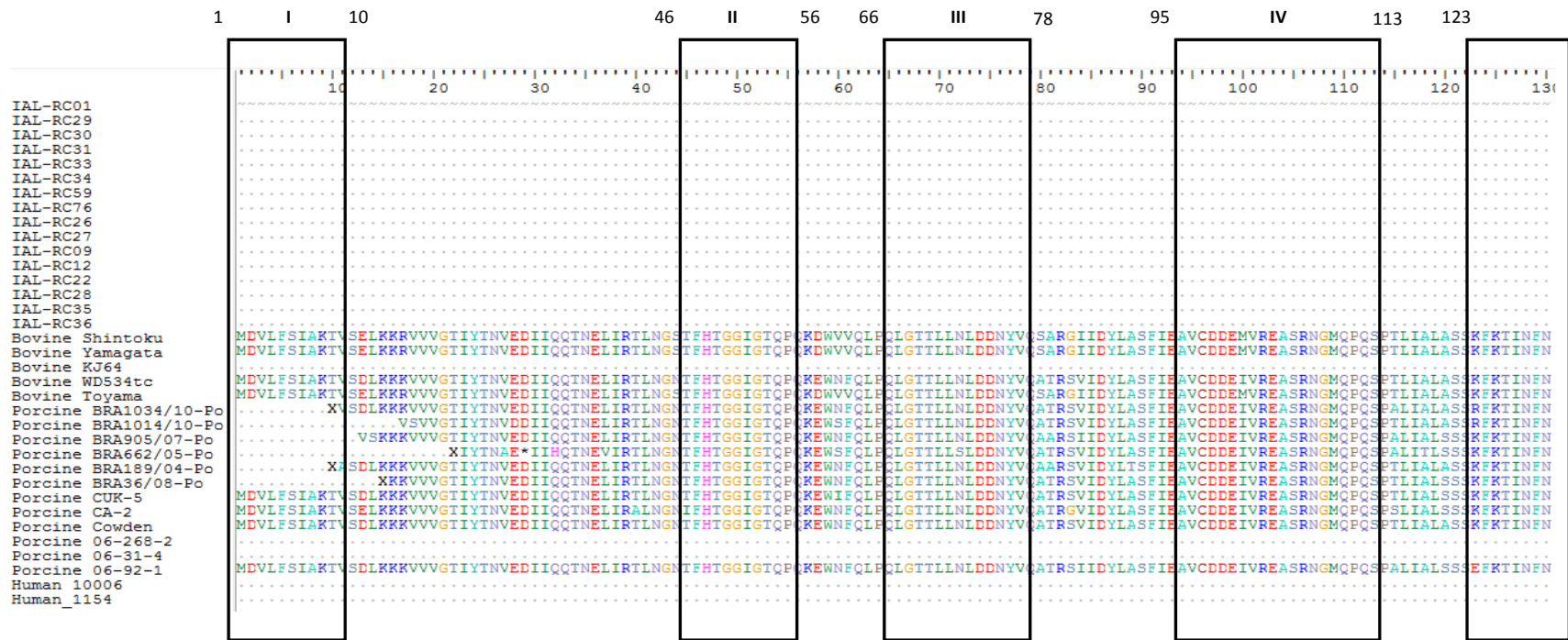


Figura 46. Árvore genealógica do tipo *Neighbor-Joining* (NJ) das sequências nucleotídicas parciais do gene VP6 de RVC das cepas IAL-RC gerada com o software MEGA 4.0. As cepas IAL-RC foram detectadas nos anos de 1988, 1993 e 2007/2008 em pacientes apresentando sintomas de gastroenterite aguda provenientes da vigilância nacional dos RV (retângulos vermelhos). Os retângulos verdes destacam as cepas de RVC com maior percentual de similaridade em relação às cepas IAL-RC. Sequências RVC VP6 de referência foram obtidas a partir do *GenBank*. I1 a I3 representam os genótipos identificados. H e I representam dois grupos geneticamente diferentes. As espécies e os números de acesso de cada cepa estão indicados. As siglas dos países de cada cepa estão descritas no Anexo 1. A escala indica a diversidade genética. Percentuais dos valores de *bootstrap* estão localizados nos nós dos ramos.



1 I 10 46 II 56 66 III 78 95 IV 113 123

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 13

Human 6325
Human 8346
Human 8392
Human 9782
Human PA24183-48BR/85
Human PA24042-78BR/86
Human PA24006-34BR/84
Human PA24006-35BR/84
Human PA24006-13BR/83
Human PA24099-49BR/84
Human PA24002-75BR/85
Human DhakaC2
Human SI-716/03
Human Moduganari
Human Jajeri
Human Preston
Human Belem
Human CAU 10-312
Human Icheon
Human BK0830
Human OH567
Human YNR001
Human BS347
Human GUP188
Human Y09-1
Human Y08-3
Human Y06-1
Human CMH004/03
Human 208
Human BCN9
Human SI-82/05
Human SI-1394/04
Human V508
Human Bristol
Human Wu82

MDVLF¹SI²AK³TV⁴SD⁵L⁶KK⁷KK⁸V⁹V¹⁰GG¹¹TI¹²Y¹³T¹⁴N¹⁵VE¹⁶D¹⁷V¹⁸V¹⁹Q²⁰T²¹NE²²L²³IR²⁴LT²⁵LN²⁶GF²⁷HT²⁸GG²⁹IG³⁰T³¹QP³²KE³³WN³⁴F³⁵QL³⁶PC³⁷LG³⁸T³⁹ILL⁴⁰N⁴¹LD⁴²DN⁴³Y⁴⁴VC⁴⁵STR⁴⁶GI⁴⁷ID⁴⁸FL⁴⁹SS⁵⁰FI⁵¹AV⁵²CD⁵³DE⁵⁴IV⁵⁵RE⁵⁶AS⁵⁷R⁵⁸NG⁵⁹M⁶⁰Q⁶¹PS⁶²AL⁶³IL⁶⁴LL⁶⁵SS⁶⁶SK⁶⁷FK⁶⁸TI⁶⁹N⁷⁰FN⁷¹

V 140 198 VI 206 245 VII 254

140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240 250 260

Human 6325
Human 8346
Human 8392
Human 9782
Human PA24183-48BR/85
Human PA24042-78BR/86
Human PA24006-34BR/84
Human PA24006-35BR/84
Human PA24006-13BR/83
Human PA24099-49BR/84
Human PA24002-75BR/85
Human DhakaC2
Human SI-716/03
Human Moduganari
Human Jajeri
Human Preston
Human Belem
Human CAU 10-312
Human Icheon
Human BK0830
Human OH567
Human YNR001
Human BS347
Human GUP188
Human Y09-1
Human Y08-3
Human Y06-1
Human CMH004/03
Human 208
Human BCN9
Human SI-82/05
Human SI-1394/04
Human V508
Human Bristol
Human Wu82

NSS¹⁴⁰Q¹⁴¹SI¹⁴²KN¹⁴³WN¹⁴⁴FA¹⁴⁵QR¹⁴⁶REN¹⁴⁷PV¹⁴⁸EY¹⁴⁹R¹⁵⁰N¹⁵¹P¹⁵²ML¹⁵³FE¹⁵⁴Y¹⁵⁵KN¹⁵⁶SY¹⁵⁷IL¹⁵⁸QR¹⁵⁹AN¹⁶⁰P¹⁶¹Q¹⁶²FG¹⁶³SV¹⁶⁴M¹⁶⁵GL¹⁶⁶RY¹⁶⁷YT¹⁶⁸TS¹⁶⁹NT¹⁷⁰CQ¹⁷¹IA¹⁷²AF¹⁷³DS¹⁷⁴TL¹⁷⁵AE¹⁷⁶NA¹⁷⁷P¹⁷⁸NN¹⁷⁹T¹⁸⁰QR¹⁸¹FV¹⁸²Y¹⁸³NG¹⁸⁴RL¹⁸⁵KR¹⁸⁶PIS¹⁸⁷N¹⁸⁸VL¹⁸⁹M¹⁹⁰K¹⁹¹IE¹⁹²AG¹⁹³AP¹⁹⁴DI¹⁹⁵SN¹⁹⁶PT¹⁹⁷IL¹⁹⁸PD¹⁹⁹PN²⁰⁰NT²⁰¹TT²⁰²WL²⁰³FN²⁰⁴FP²⁰⁵V²⁰⁶Q²⁰⁷LN²⁰⁸GT²⁰⁹FT²¹⁰

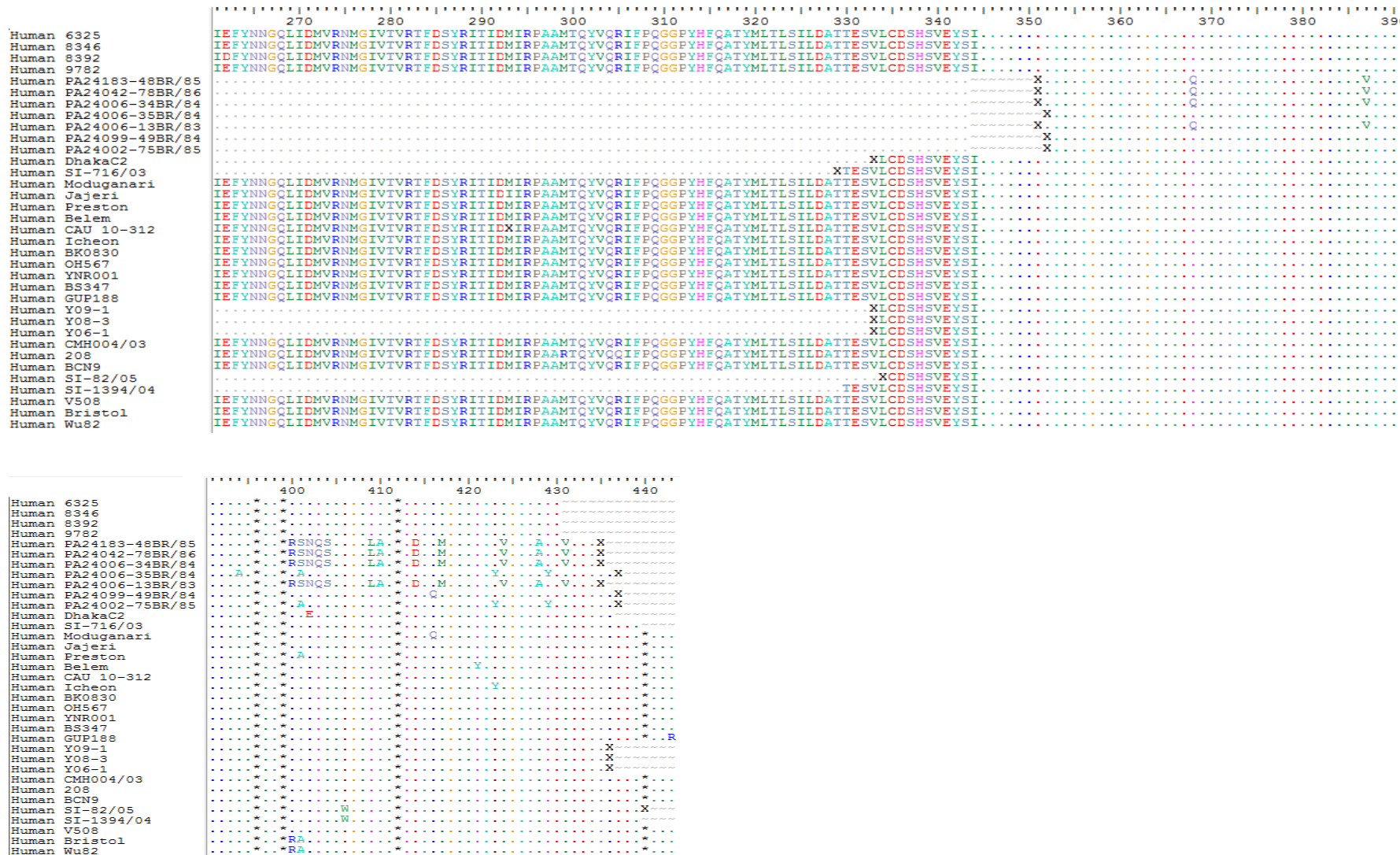


Figura 47. Alinhamento da sequência de aminoácidos deduzida a partir da sequência de nucleotídeos do gene VP6 de RVC entre as cepas IAL-RC01, IAL-RC09, IAL-RC12, IAL-RC22, IAL-RC26-31, IAL-RC33-36, IAL-RC59 e IAL-RC76 e as cepas protótipos. As regiões altamente conservadas I-VII estão indicadas. As abreviações referentes aos aminoácidos estão listadas no Anexo 2.

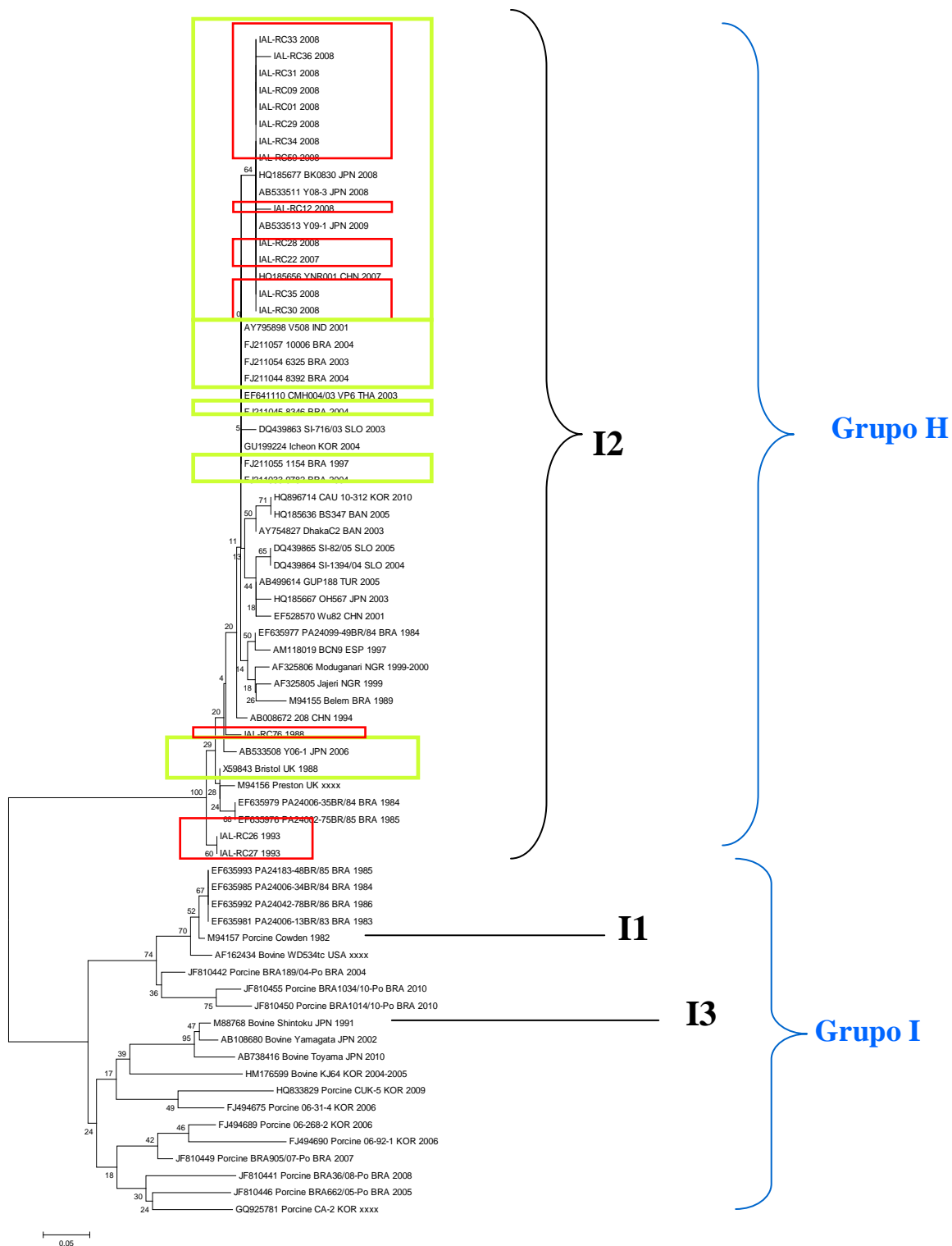


Figura 49. Árvore genealógica do tipo *Neighbor-Joining* (NJ) das sequências de aminoácidos deduzidas a partir das sequências nucleotídicas parciais do gene VP6 de RVC das cepas IAL-RC gerada com o software MEGA 4.0. As cepas IAL-RC foram detectadas nos anos de 1988, 1993 e 2007/2008 em pacientes apresentando sintomas de gastroenterite aguda provenientes da vigilância nacional dos RV (retângulos vermelhos). Os retângulos verdes destacam as cepas de RVC com maior percentual de similaridade em relação às cepas IAL-RC. Sequências RVC VP6 de referência foram obtidas a partir do *GenBank*. I1 a I3 representam os genótipos identificados. H e I representam dois grupos geneticamente diferentes. As espécies e os números de acesso de cada cepa estão indicados. As siglas dos países de cada cepa estão descritas no Anexo 1. A escala indica a diversidade genética. Percentuais dos valores de *bootstrap* estão localizados nos nós dos ramos.

4.2.4.2 Proteína VP7 – Gene 8

Os produtos das sequências de nucleotídeos obtidas para as cepas RVC VP7 foram de: 288pb (nucleotídeos 771-1059) para a cepa IAL-RC01, 443pb (nucleotídeos 620-1063) para a cepa IAL-RC09, 438pb (nucleotídeos 625-1063) para a cepa IAL-RC12, 403pb (nucleotídeos 660-1063) para a cepa IAL-RC22, 490pb (nucleotídeos 533-1023) para a cepa IAL-RC24, 411pb (nucleotídeos 652-1063) para a cepa IAL-RC26, 284pb (nucleotídeos 775-1059) para a cepa IAL-RC27, 441pb (nucleotídeos 622-1063) para a cepa IAL-RC29, 492pb (nucleotídeos 571-1063) para a cepa IAL-RC30, 355pb (nucleotídeos 675-1030) para a cepa IAL-RC31, 394pb (nucleotídeos 620-1014) para a cepa IAL-RC32, 323pb (nucleotídeos 656-979) para a cepa IAL-RC33, 392pb (nucleotídeos 623-1015) para a cepa IAL-RC34, 423pb (nucleotídeos 640-1063) para a cepa IAL-RC35, 398pb (nucleotídeos 626-1024) para a cepa IAL-RC36, 220pb (nucleotídeos 843-1063) para a cepa IAL-RC37, 285pb (nucleotídeos 774-1059) para a cepa IAL-RC43, 425pb (nucleotídeos 638-1063) para a cepa IAL-RC59 e 475pb (nucleotídeos 588-1063) para a cepa IAL-RC76. Para as análises de identidade, comparação com as cepas protótipos e construção da árvore genealógica foram utilizadas sequências com 386pb.

As cepas VP7 IAL-RC apresentaram identidade nucleotídica de 91,4-100% quando comparadas entre si (83,7-100% aa). Quando comparadas com as demais cepas humanas RVC protótipos, a similaridade nucleotídica variou de 90,4 a 100% (76,2-100% aa). As cepas humanas IAL-RC exibiram baixa identidade nucleotídica com cepas RVC VP7 animais, tanto de origem porcina (72,5-86,2% nt, 38-63,8% aa), quanto bovina (74-77,9% nt, 42,1-49,5% aa) (Figura 50 e Figura 53).

No dendrograma construído com as sequências parciais do gene VP7 (Figura 51), todas as cepas humanas de RVC, incluindo àquelas analisadas no presente estudo, agruparam em um único genótipo, G4, de acordo com o sistema de classificação proposto por Martella et al. (2007b). Todas as cepas animais utilizadas como referências tiveram seu genótipo G identificado: G1 para as cepas porcinas Cowden (M61101) e WH (U31749), G2 para as cepas bovinas Yamagata (AB108681), Shintoku (U31750) e Toyama (AB738417), G3 para a cepa porcina HF

(U31748), G5 para a cepa porcina CUK-5 (HQ833830) e G6 para as cepas porcinas 344-04-07 (EF464654), 43/06-16 (EF464656), 281/07/Dublin (EU624404) e 134/04-2 (EF464655). Recentemente, o valor de *cut-off* de 89% usado para a classificação dos genótipos VP7 dos RVC proposto por Martella et al. (2007b) foi substituído pelo valor de *cut-off* de 85%, baseando-se na frequência da identidade nucleotídica e em análises filogenéticas. Essa alteração resultou na reclassificação da cepa 1GA/05/Cork (EU624403) de G6 para genótipo G8 (Marthaler et al., 2013)

As cepas RVC VP7 IAL-RC01, IAL-RC09, IAL-RC12, IAL-RC22, IAL-RC29-35, IAL-RC43 e IAL-RC59 detectadas em 2007-2008 exibiram relação genética com cepas humana provenientes da China (YNR001) e Japão (Y09-1, Y11-1, S-1 e KU166) isoladas nas décadas de 1990 e 2000 (93,7-100% nt; 86,3-100% aa). As cepas humanas IAL-RC24, IAL-RC26, IAL-RC27 e IAL-RC37 detectadas em 1993 exibiram similaridade nucleotídica com a cepa humana ASP/88 isolada na Austrália em 1988 (96,1-97,9% nt; 91,4-94% aa) e com a cepa humana OK239 isolada no Japão em 1988 (95,8-97,6% nt; 90,5-93,1% aa). A cepa humana IAL-RC76 detectada em 1988 mostrou identidade gênica com cepas humanas européias (Bristol, Preston, BF e BCN21) isoladas entre 1988 e 2000, e com a cepa humana argentina Arg1731 detectada em 2003 (99,7-100% nt; 99,1-100% aa) (Figura 50, Figura 51, Figura 53).

A sequência de aminoácidos deduzida a partir das cepas IAL-RC01, IAL-RC09, IAL-RC12, IAL-RC22, IAL-RC24, IAL-RC26, IAL-RC27, IAL-RC29-37, IAL-RC43, IAL-RC59 e IAL-RC76 foi determinada e comparada com as cepas de RVC VP7 protótipos (Figura 52). A sequência completa do gene RVC VP7 consiste em 1063 nucleotídeos e contém uma única ORF composta por 999pb (332 aa) localizada entre os nucleotídeos 49 e 1047 (Kuzuya et al., 1996). O gene RVC VP7 também apresenta 8 regiões variáveis denominadas VR-1 (14-22 aa), VR-2 (31-57 aa), VR-3 (64-75 aa), VR-4 (83-94 aa), VR-5 (118-124 aa), VR-6 (127-137 aa), VR-7 (146-160 aa) e VR-8 (244-259 aa) (Martella et al., 2007b; Collins et al., 2008). As sequências IAL-RC apresentaram tamanho variando de 220 a 492pb (nucleotídeos 533-1063) e, portanto, os três sítios potenciais de glicosilação N (Asn-X-Ser/Thr) localizados nos resíduos de aminoácidos 67-69, 152-154 e 225-227 não puderam

ser verificados. Os resíduos de cisteína (C) localizados nos aminoácidos 3, 10, 78, 140, 170, 196 e 212 também não puderam ser identificados. Os resíduos de cisteína localizados nos aminoácidos 249 e 254 puderam ser verificados e estão presentes nas cepas humanas IAL-RC (Figura 52).

Somente a região variável VR-8 pode ser analisada. O alinhamento da sequência de aminoácidos deduzida a partir do gene VP7 revelou que houve uma substituição única nas cepas humanas IAL-RC dentro da região variável VR-8 na posição 255^{I→V}, exceto nas cepas humanas IAL-RC24, IAL-RC26 e IAL-RC27 detectadas no surto ocorrido na cidade de Valentim Gentil em 1993 (Figura 52).

Embora os percentuais de similaridade de nucleotídeos e aminoácidos obtidos variem quando as diversas cepas de RVC VP7 são comparadas entre si, a árvore genealógica construída a partir da sequência deduzida de aminoácidos (Figura 54) permite observar que as relações genéticas entre as cepas IAL-RC e as demais cepas protótipos estão mantidas. A Figura 54 também evidencia os genótipos G1 a G6 e G8, da mesma forma que foram destacados na Figura 51. Entretanto, a árvore genealógica baseada em aminoácidos (Figura 54) também permite observar que a cepa humana IAL-RC37 detectada em Valentim Gentil em 1993 não agrupou com as demais cepas, IAL-RC24, IAL-RC26 e IAL-RC27, isoladas no mesmo surto, assim como foi observado na árvore baseada em nucleotídeos (Figura 51), localizando-se na porção mais basal do grupo constituído por cepas VP7 humanas. Em adição, a Figura 54 permite observar que a cepa porcina HF (U31748), representante do genótipo G3, e a cepa porcina 1GA/05/Cork (EU624403), representante do genótipo G8, agrupam dentro do genótipo G6, o qual é composto pelas cepas porcinas 344-04-07 (EF464654), 43/06-16 (EF464656), 281/07/Dublin (EU624404) e 134/04-2 (EF464655).

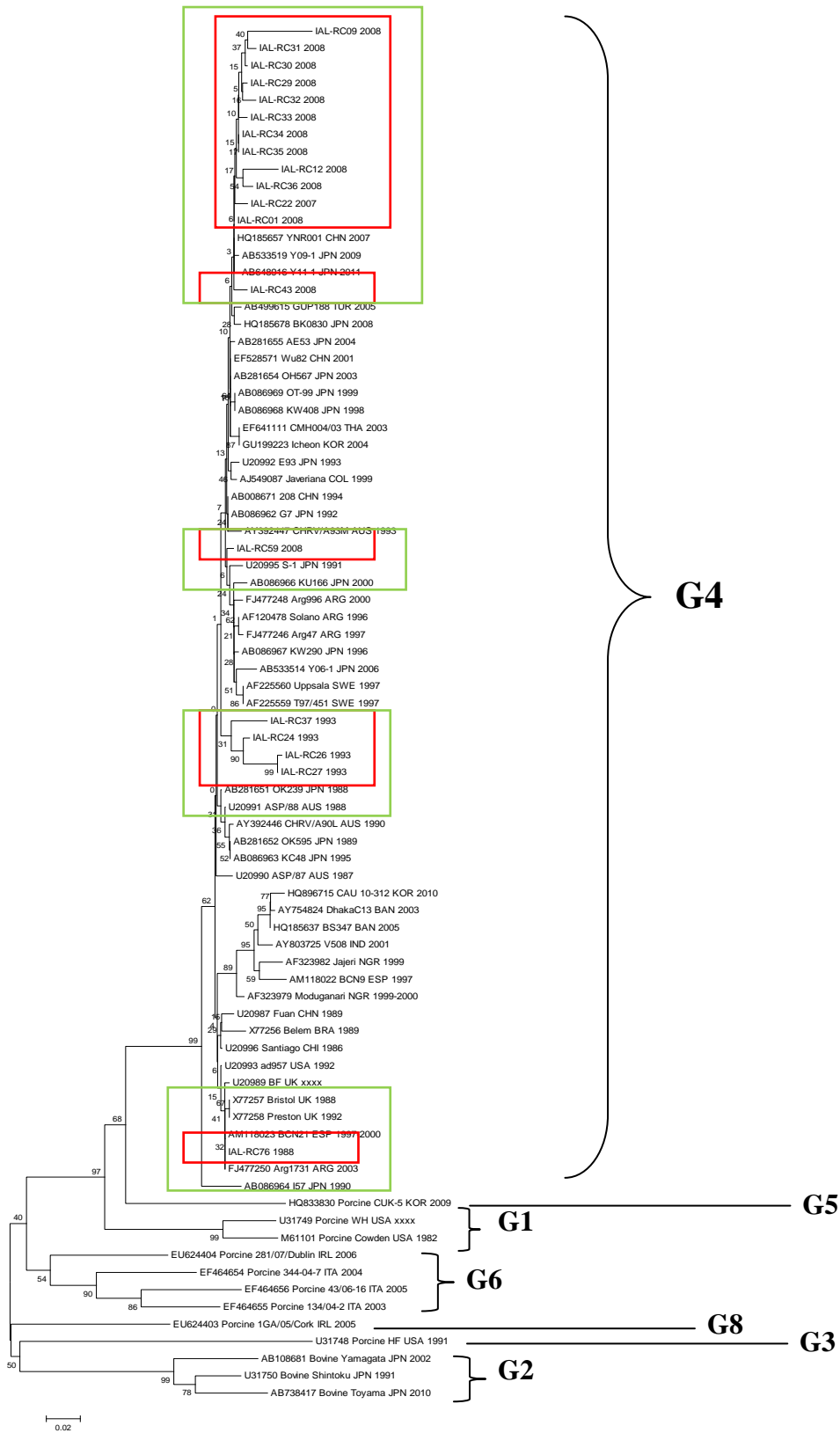
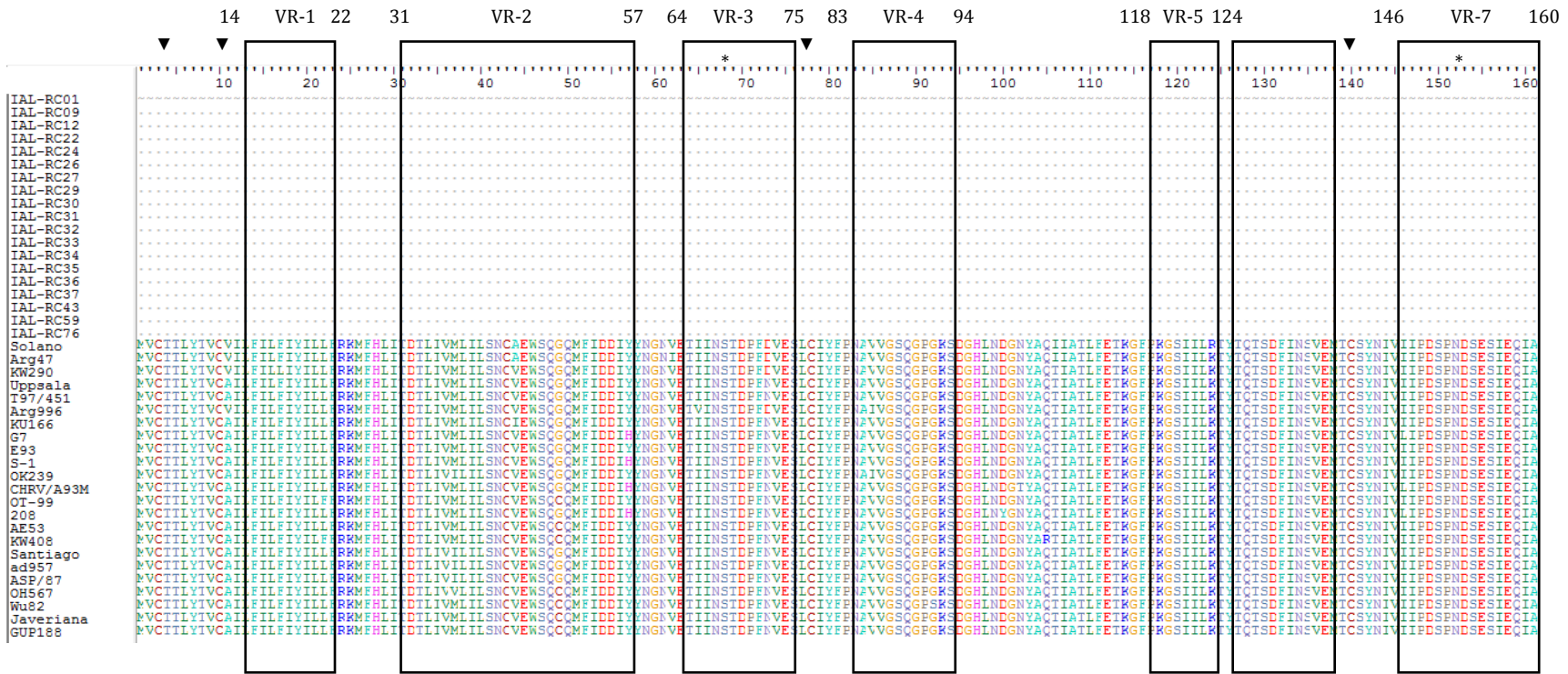


Figura 51. Árvore genealógica do tipo *Neighbor-Joining* (NJ) das sequências nucleotídicas parciais do gene VP7 de RVC das cepas IAL-RC gerada com o software MEGA 4.0. As cepas IAL-RC foram detectadas nos anos de 1988, 1993 e 2007/2008 em pacientes apresentando sintomas de gastroenterite aguda provenientes da vigilância nacional dos RV (retângulos vermelhos). Os retângulos verdes destacam as cepas de RVC com maior percentual de similaridade em relação às cepas. Sequências RVC VP7 de referência foram obtidas a partir do *GenBank*. G1 a G6 e G8 representam os genótipos identificados. As espécies e os números de acesso de cada cepa estão indicados. As siglas dos países de cada cepa estão descritas no Anexo 1. A escala indica a diversidade genética. Percentuais dos valores de *bootstrap* estão localizados nos nós dos ramos.



244 VR-8 259

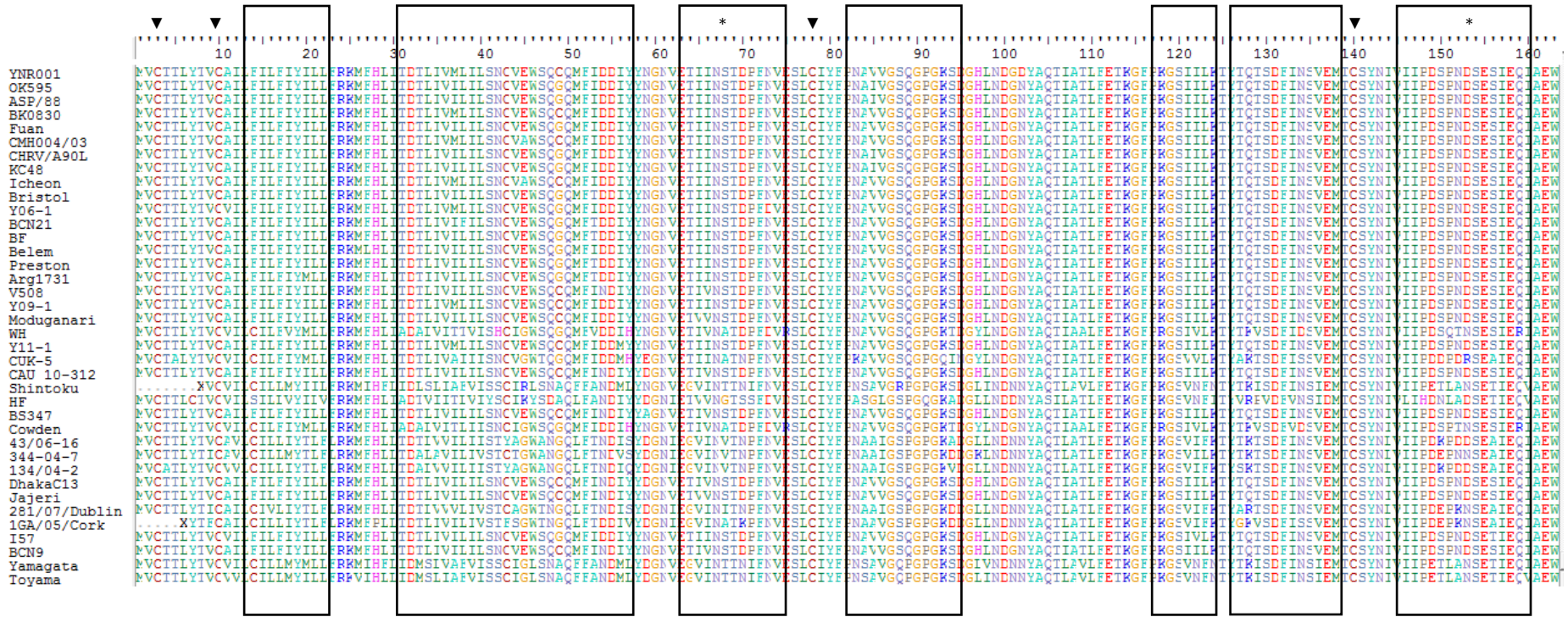


```

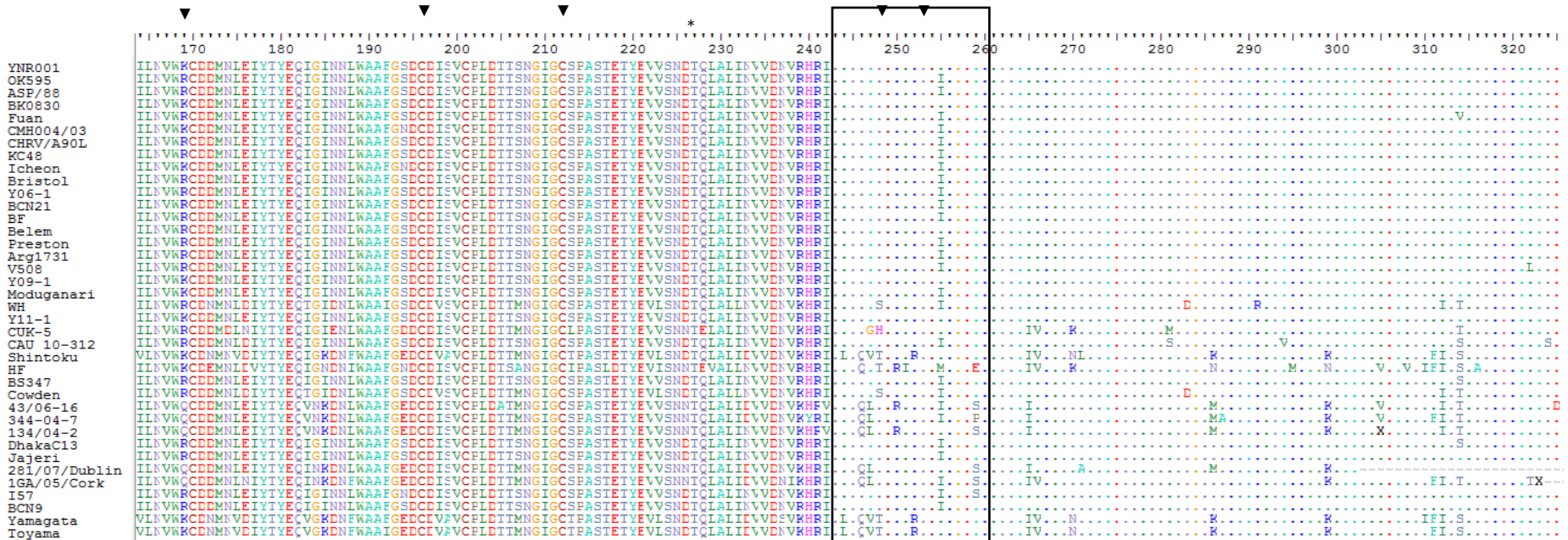
|.....|.....|
330
IAL-RC01  EGWMLRYA*TRS*~
IAL-RC09  .....*...CG
IAL-RC12  .....*...DVG
IAL-RC22  ..LI.....*...CG
IAL-RC24  .....*...CG
IAL-RC26  ..FFF.....*...CG
IAL-RC27  .....*...*
IAL-RC29  ..I.....*...CG
IAL-RC30  ..CL.....*...CG
IAL-RC31  ..X.....*...CG
IAL-RC32  .....*...CG
IAL-RC33  .....*...CG
IAL-RC34  .....*...CG
IAL-RC35  .....*...CG
IAL-RC36  ..X.....*...CG
IAL-RC37  .....*...CG
IAL-RC43  .....*...C.
IAL-RC59  .....*...CG
IAL-RC76  .....*...CG
Solano   .....*...CG
Arg47    .....*...CG
KW290    .....*...CG
Uppsala  .....*...CG
T97/451  .....*...CG
Arg996   .....*...CG
KU166    .....*...CG
G7       .....*...CG
E93      .....*...CG
S-1      .....*...CG
OK239    .....*...CG
CHRV/A93M .....*...CG
OT-99    .....*...CG
208      .....*...CG
AE53     .....*...CG
KW408    .....*...CG
Santiago  .....*...CG
ad957    .....*...CG
ASP/87   .....*...CG
OH567    .....*...CG
Wu82     .....*...CG
Javeriana .....*...CG
GUP188   .....*...CG

```


14 VR-1 22 31 VR-2 57 64 VR-3 75 83 VR-4 94 127 VR-6 137 146 VR-7 160



244 VR-8 259



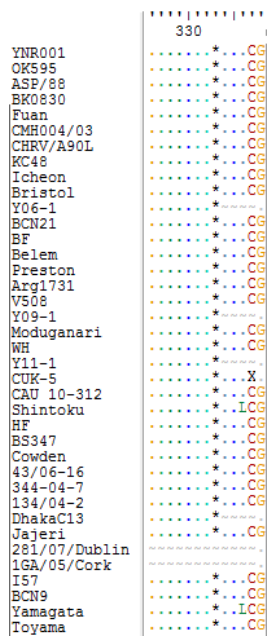


Figura 52. Alinhamento da sequência de aminoácidos deduzida a partir da sequência de nucleotídeos do gene VP7 de RVC entre as cepas IAL-RC01, IAL-RC09, IAL-RC12, IAL-RC22, IAL-RC24, IAL-RC26, IAL-RC27, IAL-RC29-37, IAL-RC43, IAL-RC59 e IAL-RC76 e as cepas protótipos. As regiões variáveis de VR-1 a VR-8 estão indicadas. Os três sítios de glicosilação N (Asn-X-Ser/Thr) localizados nos aminoácidos 67-69, 152-154 e 225-227 estão indicados por asteriscos. Os resíduos conservados de cisteína (▼) estão indicados. As abreviações referentes aos aminoácidos estão listadas no Anexo 2.

Javeriana	GUP188	WYR001	OK595	ASP/88	BK0830	Fuan	CMH004	AJ04	KC48	Icheon	Bristol	Y06-1	BCN21	IF	Belem	Preston	ArgT31	V508	Y09-1	Mudagan/WH	Y11-1	CUK-5	CAU10	Shintoku	HF	BS347	Cowden	43/06-16	B44-04-7	134/04-2	Dhaka13	Jajeri	281/07	IGA/05	S7	BCN9	Yamagata	Toyama	
98.2%	99.1%	100.0%	95.7%	95.7%	98.2%	94.0%	98.2%	94.8%	95.7%	98.2%	94.0%	94.0%	94.8%	94.0%	92.3%	94.0%	94.8%	87.1%	100.0%	91.4%	60.0%	99.1%	63.8%	84.7%	49.5%	40.9%	59.1%	51.6%	56.6%	51.2%	85.4%	83.7%	56.3%	54.1%	87.1%	85.4%	47.9%	47.9%	
89.7%	90.5%	91.4%	88.0%	88.0%	89.7%	85.4%	90.5%	87.1%	88.0%	90.5%	86.3%	86.3%	86.3%	84.6%	86.3%	86.3%	79.4%	91.4%	82.9%	53.3%	90.5%	57.9%	76.2%	45.4%	38.0%	77.7%	52.5%	45.0%	48.3%	46.2%	76.9%	76.9%	50.4%	48.3%	79.4%	77.7%	42.1%	43.8%	
91.5%	92.3%	93.2%	89.8%	89.8%	91.5%	87.2%	92.3%	88.9%	89.8%	92.3%	87.2%	87.2%	88.1%	87.2%	85.5%	87.2%	88.1%	80.5%	93.2%	84.7%	56.1%	92.3%	59.1%	78.1%	48.7%	38.0%	79.6%	56.1%	49.5%	53.7%	49.1%	78.8%	77.9%	52.5%	49.5%	81.3%	78.8%	47.1%	47.1%
96.5%	97.4%	98.2%	94.0%	94.0%	96.5%	92.3%	96.5%	93.1%	94.0%	96.5%	93.1%	92.3%	93.1%	92.3%	90.5%	93.1%	93.1%	85.4%	98.2%	89.7%	59.1%	97.4%	63.0%	83.0%	49.5%	40.9%	84.6%	58.3%	50.8%	55.8%	50.4%	83.7%	82.0%	56.3%	53.3%	85.4%	83.7%	47.1%	47.1%
91.4%	92.3%	93.1%	94.0%	94.0%	91.4%	94.8%	91.4%	94.8%	94.0%	91.4%	96.5%	88.8%	96.5%	95.7%	92.3%	96.5%	96.5%	86.3%	93.1%	90.5%	57.5%	92.3%	62.1%	85.5%	49.5%	40.9%	87.1%	56.6%	51.6%	55.8%	49.5%	86.3%	84.6%	55.4%	50.8%	86.3%	88.0%	47.9%	47.1%
89.8%	90.6%	91.5%	92.3%	92.3%	89.8%	93.2%	89.8%	93.2%	89.8%	94.0%	87.2%	94.8%	94.0%	90.6%	94.0%	94.0%	94.8%	84.7%	91.5%	88.9%	57.0%	90.6%	61.3%	84.0%	48.3%	39.3%	85.5%	56.1%	52.0%	55.3%	50.0%	84.7%	83.0%	54.1%	51.2%	84.7%	85.4%	47.9%	46.7%
99.8%	99.6%	91.5%	92.3%	92.3%	89.8%	93.2%	89.8%	93.2%	89.8%	94.0%	87.2%	94.8%	94.0%	90.6%	94.0%	94.0%	94.8%	84.7%	91.5%	88.9%	57.0%	90.6%	61.3%	84.0%	48.3%	39.3%	85.5%	56.1%	52.0%	55.3%	50.0%	84.7%	83.0%	54.1%	51.2%	84.7%	85.4%	47.9%	46.7%
96.7%	97.4%	98.2%	94.0%	94.0%	96.6%	92.3%	96.6%	93.1%	94.0%	96.6%	93.1%	92.3%	93.1%	92.3%	90.6%	93.1%	93.1%	85.5%	98.3%	89.8%	58.0%	97.4%	63.0%	83.1%	49.3%	41.3%	84.7%	58.0%	50.4%	55.7%	50.8%	83.8%	82.0%	55.3%	52.3%	86.3%	84.6%	46.7%	46.7%
95.7%	96.6%	97.4%	94.0%	94.0%	95.7%	91.5%	95.7%	92.3%	94.0%	95.7%	91.5%	91.5%	92.3%	91.5%	89.8%	91.5%	92.3%	84.7%	91.5%	88.9%	57.0%	90.6%	61.3%	84.0%	47.5%	40.9%	83.8%	50.4%	54.5%	50.8%	83.0%	82.0%	55.3%	52.3%	85.5%	83.0%	45.9%	45.9%	
94.9%	95.7%	96.6%	93.2%	93.2%	94.9%	90.6%	94.9%	92.3%	93.2%	94.9%	91.5%	90.6%	91.5%	90.6%	88.9%	91.5%	91.5%	83.8%	96.6%	88.1%	57.0%	95.7%	62.1%	81.5%	47.5%	40.9%	83.0%	57.0%	49.5%	53.7%	50.0%	82.2%	81.3%	55.0%	52.0%	84.7%	82.2%	45.0%	45.0%
94.9%	96.6%	96.6%	93.2%	93.2%	96.6%	92.3%	94.9%	92.3%	93.2%	94.9%	90.6%	90.6%	91.5%	90.6%	88.9%	90.6%	91.5%	83.8%	96.6%	88.1%	57.0%	95.7%	62.1%	81.5%	48.3%	40.9%	83.0%	57.0%	49.5%	54.5%	50.8%	82.2%	81.3%	55.0%	52.0%	84.7%	82.2%	46.7%	46.7%
96.5%	97.4%	98.2%	94.8%	94.8%	96.5%	92.3%	96.5%	94.0%	94.8%	96.5%	92.3%	92.3%	93.1%	92.3%	90.5%	92.3%	93.1%	85.4%	98.2%	89.7%	58.3%	97.4%	62.1%	83.0%	47.9%	40.9%	84.6%	58.3%	50.8%	55.0%	51.2%	83.7%	82.9%	55.4%	53.3%	86.3%	83.7%	46.2%	46.2%
97.4%	98.2%	99.1%	95.7%	95.7%	97.4%	93.1%	97.4%	94.0%	94.8%	97.4%	93.1%	93.1%	94.0%	93.1%	91.4%	93.1%	94.0%	86.3%	99.1%	90.5%	59.1%	98.2%	63.0%	83.8%	48.7%	41.3%	85.4%	59.1%	51.6%	55.8%	51.2%	84.6%	83.7%	56.3%	53.3%	87.1%	84.6%	47.1%	47.1%
97.4%	98.2%	99.1%	95.7%	95.7%	97.4%	93.1%	97.4%	94.0%	94.8%	97.4%	93.1%	93.1%	94.0%	93.1%	91.4%	93.1%	94.0%	86.3%	99.1%	90.5%	59.1%	98.2%	63.0%	83.8%	48.7%	41.3%	85.4%	59.1%	51.6%	55.8%	51.2%	84.6%	83.7%	55.4%	53.3%	86.3%	84.6%	47.9%	47.9%
97.4%	98.2%	99.1%	94.8%	94.8%	97.4%	93.1%	97.4%	94.0%	94.8%	97.4%	93.1%	93.1%	94.0%	93.1%	91.4%	93.1%	94.0%	86.3%	99.1%	90.5%	60.0%	98.2%	63.0%	83.8%	49.5%	40.9%	85.4%	59.1%	51.6%	56.6%	51.2%	84.6%	82.9%	55.4%	53.3%	86.3%	84.6%	47.9%	47.9%
91.4%	91.4%	92.3%	91.4%	91.4%	90.5%	92.3%	90.5%	92.3%	91.4%	90.5%	93.1%	88.0%	94.0%	93.1%	89.7%	93.1%	94.0%	83.7%	92.3%	88.0%	57.5%	91.4%	62.1%	83.0%	48.7%	40.9%	84.6%	56.6%	50.8%	55.8%	48.7%	83.7%	82.9%	56.3%	50.0%	84.6%	85.4%	49.5%	47.1%
96.5%	97.4%	98.2%	94.0%	94.0%	96.5%	92.3%	96.5%	94.8%	94.0%	96.5%	94.0%	92.3%	94.8%	94.0%	90.5%	94.0%	94.8%	87.1%	98.2%	89.7%	60.0%	97.4%	63.0%	84.0%	49.5%	41.3%	86.3%	59.1%	52.5%	57.5%	50.0%	85.4%	82.9%	55.4%	52.3%	85.4%	85.4%	47.9%	47.9%
95.7%	96.5%	97.4%	96.5%	96.5%	95.7%	94.8%	95.7%	96.5%	95.7%	94.8%	94.8%	95.7%	94.8%	95.7%	94.8%	94.8%	95.7%	88.0%	97.4%	92.3%	60.0%	96.5%	63.0%	85.5%	49.5%	41.3%	87.1%	59.1%	51.6%	56.6%	51.2%	86.3%	84.6%	57.9%	55.8%	88.0%	86.3%	47.9%	47.9%
93.1%	94.0%	94.8%	97.4%	97.4%	93.1%	97.4%	93.1%	98.2%	97.4%	93.1%	92.3%	100.0%	99.1%	94.0%	94.0%	94.0%	94.8%	88.8%	94.8%	93.1%	59.1%	94.0%	62.1%	88.1%	48.7%	40.9%	89.7%	58.3%	51.6%	56.6%	51.2%	86.3%	84.6%	49.5%	51.2%	89.7%	90.5%	48.7%	47.1%
94.8%	95.7%	96.5%	95.7%	95.7%	94.8%	94.0%	94.8%	94.8%	95.7%	94.8%	94.0%	95.7%	94.8%	94.0%	92.3%	94.0%	94.8%	88.8%	96.5%	94.8%	60.0%	95.7%	62.1%	86.4%	47.9%	41.3%	88.0%	59.1%	50.0%	55.0%	49.5%	87.1%	85.4%	56.3%	54.1%	87.1%	87.1%	46.2%	46.2%
94.8%	95.7%	96.5%	95.7%	95.7%	94.8%	94.0%	94.8%	94.8%	95.7%	94.8%	94.0%	95.7%	94.8%	94.0%	92.3%	94.0%	94.8%	88.8%	96.5%	94.8%	60.0%	95.7%	62.1%	86.4%	47.9%	41.3%	88.0%	59.1%	50.0%	55.0%	49.5%	87.1%	85.4%	56.3%	54.1%	87.1%	87.1%	46.2%	46.2%
94.0%	94.8%	95.7%	94.8%	94.8%	94.0%	93.1%	94.0%	94.0%	94.8%	94.0%	93.1%	97.4%	94.0%	94.8%	93.1%	93.1%	94.0%	86.3%	95.7%	90.5%	58.8%	94.8%	64.4%	83.8%	47.9%	41.3%	85.4%	56.6%	51.2%	55.0%	50.8%	84.6%	82.9%	56.7%	55.4%	86.3%	84.6%	46.2%	46.2%
96.0%	96.5%	97.4%	96.5%	96.5%	94.8%	94.0%	96.0%	96.5%	96.5%	94.8%	94.0%	95.7%	94.8%	94.0%	92.3%	94.0%	94.8%	88.8%	96.5%	94.8%	60.0%	95.7%	62.1%	86.4%	47.9%	41.3%	86.3%	58.3%	50.8%	55.8%	50.4%	85.4%	83.7%	55.4%	53.3%	86.3%	84.6%	47.1%	47.1%
93.1%	94.8%	94.8%	94.0%	94.0%	93.1%	94.0%	93.1%	94.0%	93.1%	94.0%	93.1%	94.0%	93.1%	94.0%	93.1%	94.0%	93.1%	85.4%	94.8%	89.7%	58.3%	97.4%	63.0%	83.8%	50.4%	40.9%	86.3%	57.5%	50.0%	53.3%	48.7%	83.7%	82.9%	55.4%	54.1%	85.4%	83.7%	47.1%	47.1%
97.4%	98.2%	99.1%	96.5%	96.5%	97.4%	94.8%	97.4%	96.5%	97.4%	94.8%	94.8%	95.7%	94.8%	94.8%	93.1%	94.8%	95.7%	88.0%	99.1%	92.3%	60.0%	98.2%	64.7%	85.5%	49.5%	41.3%	87.1%	60.0%	52.5%	57.5%	52.1%	86.3%	84.6%	57.1%	55.0%	88.0%	86.3%	47.9%	47.9%
97.4%	98.2%	99.1%	94.8%	94.8%	95.7%	93.1%	97.4%	94.0%	94.8%	95.7%	93.1%	93.1%	94.0%	93.1%	91.4%	93.1%	94.0%	86.3%	99.1%	90.5%	60.0%	98.2%	63.0%	83.8%	49.5%	40.9%	85.4%	59.1%	51.6%	57.5%	51.2%	84.6%	82.9%	55.4%	53.3%	86.3%	84.6%	47.2%	46.2%
94.8%	95.7%	96.5%	95.7%	95.7%	94.8%	94.0%	94.8%	94.8%	95.7%	94.8%	94.0%	95.7%	94.8%	94.0%	92.3%	94.0%	94.8%	88.8%	96.5%	94.8%	60.0%	95.7%	62.1%	86.4%	47.9%	41.3%	88.0%	59.1%	50.0%	55.0%	50.4%	87.1%	83.7%	56.3%	55.8%	87.1%	85.4%	49.5%	48.7%
94.8%	95.7%	96.5%	99.1%	99.1%	94.8%	95.7%	94.8%	98.2%	99.1%	94.8%	95.7%	94.0%	96.5%	95.7%	94.0%	95.7%	96.5%	88.8%	96.5%	91.4%	58.3%	95.7%	62.1%	86.4%	47.9%	40.9%	88.0%	59.1%	50.8%	55.8%	52.1%	87.1%	87.1%	56.3%	55.0%	89.7%	87.1%	46.2%	46.2%
94.8%	95.7%	96.5%	94.0%	94.0%	94.8%	92.3%	94.8%	93.1%	94.0%	94.8%	92.3%	93.1%	93.1%	92.3%	90.5%	92.3%	93.1%	87.1%	96.5%	89.7%	60.0%	95.7%	63.0%	84.7%	49.5%	40.9%	86.3%	59.1%	50.8%	56.6%	51.2%	86.3%	84.6%	55.4%	53.3%	85.4%	85.4%	46.2%	46.2%
97.4%	98.2%	99.1%	94.8%	94.8%	97.4%	93.1%	97.4%	94.0%	94.8%	97.4%	93.1%	93.1%	94.0%	93.1%	91.4%	93.1%	94.0%	86.3%	99.1%	90.5%	60.0%	98.2%	63.0%	83.8%	48.7%	40.9%	86.3%	58.3%	50.8%	55.8%	51.2%	84.6%	82.9%	55.4%	53.3%	86.3%	84.6%	47.1%	47.1%
97.4%	98.2%	99.1%	96.5%	96.5%	97.4%	94.8%	97.4%	96.5%	97.4%	94.8%	94.8%	95.7%	94.8%	94.8%	93.1%	94.8%	95.7%	88.0%	99.1%	92.3%	60.0%	98.2%	64.7%	85.5%	49.5%	41.3%	87.1%	60.0%	52.5%	57.5%	52.1%	86.3%	84.6%	57.1%	55.0%	88.0%	86.3%	47.9%	47.9%
94.8%	95.7%	96.5%	95.7%	95.7%	94.8%	94.0%	94.8%	94.8%	95.7%	94.8%	94.0%	95.7%	94.8%	94.0%	92.3%	94.0%	94.8%	88.8%	96.5%	94.8%	60.0%	95.7%	62.1%	86.4%	47.9%	41.3%	88.0%	59.1%	50.0%	55.0%	50.4%	87.1%	83.7%	56.3%	55.8%	87.1%	85.4%	49.5%	48.7%
94.0%	94.8%	95.7%	98.2%	98.2%	94.0%	98.2%	94.0%	98.2%	93.1%	98.2%	93.1%	98.2%	93.1%	98.2%	94.8%	98.2%	99.1%	88.0%	95.7%	94.0%	58.3%	94.8%	63.0%	87.2%	47.9%	40.9%	88.8%	57.5%	50.8%	55.8%	50.4%	88.0%	8						

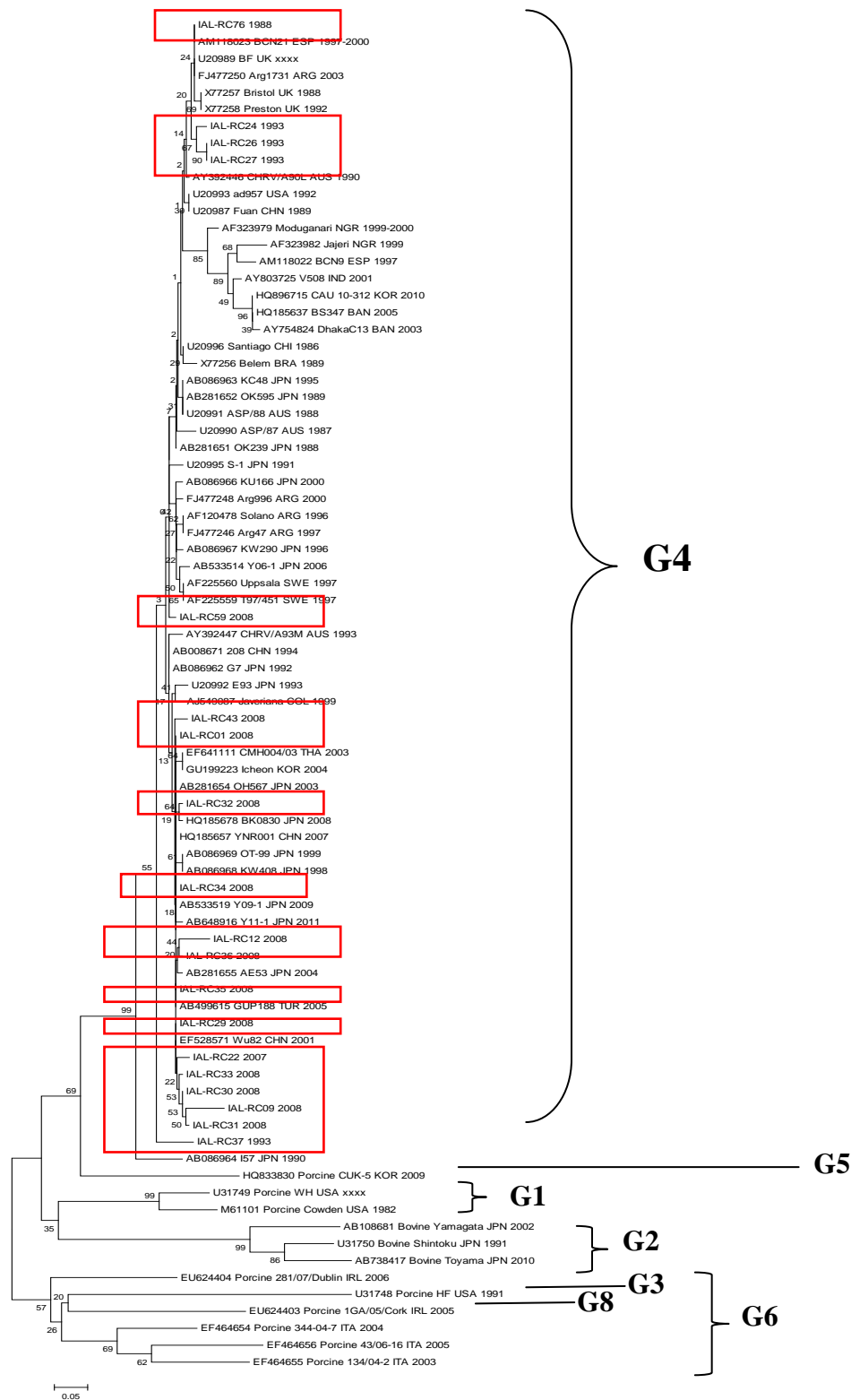


Figura 54. Árvore genealógica do tipo *Neighbor-Joining* (NJ) das sequências de aminoácidos deduzidas a partir das sequências nucleotídicas parciais do gene VP7 de RVC das cepas IAL-RC gerada com o software MEGA 4.0. As cepas IAL-RC foram detectadas nos anos de 1988, 1993 e 2007/2008 em pacientes apresentando sintomas de gastroenterite aguda provenientes da vigilância nacional dos RV (retângulos vermelhos). Sequências RVC VP7 de referência foram obtidas a partir do *GenBank*. G1 a G6 e G8 representam os genótipos identificados. As espécies e os números de acesso de cada cepa estão indicados. As siglas dos países de cada cepa estão descritas no Anexo 1. A escala indica a diversidade genética. Percentuais dos valores de *bootstrap* estão localizados nos nós dos ramos.

4.2.4.3 Proteína VP4 – Gene 3

Os produtos das sequências de nucleotídeos obtidas para as cepas RVC VP4 foram de: 1021pb (nucleotídeos 92-1113) para a cepa IAL-RC09, 910pb (nucleotídeos 203-1113) para a cepa IAL-RC12, 686pb (nucleotídeos 259-945) para a cepa IAL-RC22, 969pb (nucleotídeos 144-1113) para a cepa IAL-RC26, 937pb (nucleotídeos 148-1085) para a cepa IAL-RC27, 897pb (nucleotídeos 216-1113) para a cepa IAL-RC30, 873pb (nucleotídeos 172-1045) para a cepa IAL-RC31, 958pb (nucleotídeos 153-1111) para a cepa IAL-RC33, 914pb (nucleotídeos 218-1132) para a cepa IAL-RC34, 910pb (nucleotídeos 203-1113) para a cepa IAL-RC36, 1064pb (nucleotídeos 62-1126) para a cepa IAL-RC43 e 980pb (nucleotídeos 132-1112) para a cepa IAL-RC59. Para as análises de identidade, comparação com as cepas protótipos e construção da árvore genealógica foram utilizadas sequências com 963pb.

O gene VP4 de todas as sequências humanas de RVC, incluindo as cepas brasileiras IAL-RC analisadas no presente estudo, agruparam em um único genótipo, P[2]. As cepas RVC VP4 animais foram designadas como genótipos P[1] (cepa porcina Cowden) e P[3] (cepas bovinas Shintoku e Toyama) (Figura 56). Essa denominação foi provisoriamente proposta por Yamamoto et al. (2011), seguindo a nomenclatura utilizada para designar os genótipos de RVA (Mathijnsens et al., 2008b). A Figura 56 também permite observar que as cepas RVC analisadas estão divididas em dois grupos geneticamente diferentes, denominados nesse estudo J e L. O grupo J é composto exclusivamente por cepas humanas, enquanto o grupo L possui apenas cepas de origem animal.

As sequências parciais do gene VP4 das cepas IAL-RC mostraram elevada identidade genética com outras cepas humanas P[2], variando de 94% a 100% na identidade nucleotídica e 84,7-100% na identidade de aminoácidos (Figura 55 e Figura 58). As cepas RVC VP4 IAL-RC09, IAL-RC12, IAL-RC22, IAL-RC30, IAL-RC31, IAL-RC33, IAL-RC34, IAL-RC36, IAL-RC43 e IAL-RC59 detectadas em 2007-2008 exibiram relações genéticas com cepas humanas de RVC isoladas no continente asiático, especialmente China (HQ185655) e Japão (AB533525 e

AB648917) detectadas entre 2007 e 2011 (97,9-100% nt; 95,6-100% aa) (Figura 55, Figura 56 e Figura 58).

As outras cepas humanas IAL-RC26 e IAL-RC27 detectadas em 1993 agruparam com cepas humanas provenientes do Reino Unido (Bristol-X79442) (95,8-98,7% nt; 95,6% aa) isolada em 1988, e do Brasil (Belem-X79441) (95,6-98,3% nt; 94,1% aa) detectada em 1989. Ainda, as cepas analisadas no presente estudo apresentaram baixa identidade nucleotídica e de aminoácidos em relação às cepas de origem animal pertencentes aos genótipos P[1] (69,5-69,8% nt; 32,5-32,8% aa) e P[3] (65,3-66,9% nt; 28,6-32,3% aa) (Figura 55, Figura 56 e Figura 58).

A sequência de aminoácidos deduzida a partir das cepas IAL-RC09, IAL-RC12, IAL-RC22, IAL-RC26, IAL-RC27, IAL-RC30, IAL-RC31, IAL-RC33, IAL-RC34, IAL-RC36, IAL-RC43 e IAL-RC59 foi determinada e comparada com as cepas de RVC VP4 protótipos (Figura 57). A sequência completa do gene RVC VP4 em cepas de origem humana consiste em 2283 nucleotídeos e contém uma única ORF composta por 2232pb (744 aa) localizada entre os nucleotídeos 20 e 2252 (Fielding et al., 1994). A sequência completa do gene RVC VP4 em cepas de origem bovina possui 30 nucleotídeos a menos que as cepas RVC VP4 humanas, sendo constituída por 2253 nucleotídeos. Essa diferença é resultado de três deleções (9 nucleotídeos na posição 635, 18 nucleotídeos na posição 760 e 6 nucleotídeos na posição 1157) e duas inserções (1 nucleotídeo na região 5' não traduzida na posição 6 e 2 nucleotídeos na região 3' não traduzida na posição 2238). Ainda, as cepas RVC VP4 bovinas possuem uma longa ORF localizada entre os nucleotídeos 22 e 2220 que codifica uma proteína de 733 aa (Jiang et al., 1999). Quando cepas RVC VP4 bovinas e porcinas são comparadas entre si, uma deleção de 9 nucleotídeos na posição 644 pode ser observada nas cepas bovinas. Ainda, existem 16 nucleotídeos faltando na porção 5' terminal nas cepas porcinas (Jiang et al., 1999). A ORF do gene RVC VP4 de origem suína codifica uma proteína de 736 aa (Bremont et al., 1992). O gene RVC VP4 apresenta um domínio de clivagem proteolítica localizado entre os aminoácidos 231 e 250, o qual não possui resíduos de arginina (Fielding et al., 1994).

A proteína VP4 das cepas RVC IAL-RC apresentou os sítios de clivagem pela tripsina conservados e localizados nos resíduos de lisina (K) 231, 239, 244, 247 e 248. O alinhamento da sequência de aminoácidos deduzida a partir do gene VP4 revelou a existência de substituições nas cepas humanas IAL-RC nas posições: 129^{N→D}, 139^{E/D→V}, 181^{R→K}, 243^{M→I} (localizado dentro do domínio de clivagem), 292^{V→I} e 333^{N→I}. Curiosamente, essas substituições não foram observadas nas cepas humanas IAL-RC26 e IAL-RC27 detectadas no surto ocorrido na cidade de Valentim Gentil em 1993. O alinhamento da sequência de aminoácidos deduzida a partir do gene VP4 também permitiu identificar as deleções de aminoácidos características das cepas de origem animal: ²⁰⁸NPGI²¹² presente apenas nas cepas bovinas (Shintoku-U26551, Toyama-AB738415), ²⁵⁴KLGDGPI²⁶⁰ presente nas cepas bovinas e porcina (Cowden-M74218) e localizada próxima ao sítio de clivagem proteolítica (231-250 aa), e ³⁸⁸QXS³⁹⁰ presente em todas as cepas animais (Figura 57).

A árvore genealógica construída a partir da sequência deduzida de aminoácidos (Figura 59) permite observar que as relações genéticas entre as cepas IAL-RC09, IAL-RC12, IAL-RC22, IAL-RC26, IAL-RC27, IAL-RC30, IAL-RC31, IAL-RC33, IAL-RC34, IAL-RC36, IAL-RC43 e IAL-RC59 e as demais cepas humanas protótipos estão mantidas. A Figura 59 também evidencia os dois grupos geneticamente distintos, denominados neste estudo como J e L, da mesma forma que foram destacados na Figura 56.

	IAL-RC09	IAL-RC12	IAL-RC22	IAL-RC26	IAL-RC27	IAL-RC30	IAL-RC31	IAL-RC33	IAL-RC34	IAL-RC36	IAL-RC43	IAL-RC59	Moduganari	Y08-4	Y06-1	Y09-1	Y11-1	CAU10-312	Jajeri	YNR001	BS347	OH567	Wu82	Shintoku	Cowden	AS7J	GUP188	CVH004/0	Z08	BCN9	V508	Belem	Bristol	Toyama	
IAL-RC09		100,0%	99,8%	95,5%	95,5%	99,8%	100,0%	99,8%	98,4%	99,6%	99,7%	99,7%	97,3%	99,8%	96,2%	95,5%	99,4%	96,3%	97,2%	99,8%	97,0%	95,8%	96,1%	66,5%	69,6%	95,7%	96,1%	95,6%	96,8%	98,0%	97,8%	95,5%	95,7%	66,0%	
IAL-RC12				99,8%	95,5%	99,8%	100,0%	99,8%	98,4%	99,6%	99,7%	99,7%	97,3%	99,8%	96,2%	95,5%	99,4%	96,3%	97,2%	99,8%	97,0%	95,8%	96,1%	66,5%	69,6%	95,7%	96,1%	95,6%	96,8%	98,0%	97,8%	95,5%	95,7%	66,0%	
IAL-RC22					95,6%	100,0%	99,8%	99,7%	98,3%	99,7%	99,8%	99,8%	97,4%	100,0%	96,3%	95,6%	99,5%	96,4%	97,3%	100,0%	97,1%	95,9%	96,2%	66,7%	69,6%	95,8%	96,2%	95,7%	96,9%	98,1%	97,9%	95,6%	95,8%	66,1%	
IAL-RC26						100,0%	95,6%	95,5%	95,4%	94,2%	95,6%	95,5%	96,3%	95,6%	96,2%	96,1%	95,2%	95,6%	96,2%	95,6%	95,8%	96,2%	96,5%	66,9%	69,8%	97,3%	96,5%	96,0%	97,0%	96,9%	96,7%	98,3%	98,7%	66,7%	
IAL-RC27							95,6%	95,5%	95,4%	94,2%	95,6%	95,5%	96,3%	95,6%	96,2%	96,1%	95,2%	95,6%	96,2%	95,6%	95,8%	96,2%	96,5%	66,9%	69,8%	97,3%	96,5%	96,0%	97,0%	96,9%	96,7%	98,3%	98,7%	66,7%	
IAL-RC30								99,8%	99,7%	98,3%	99,8%	99,8%	97,4%	100,0%	96,3%	95,6%	99,5%	96,4%	97,3%	100,0%	97,1%	95,9%	96,2%	66,7%	69,6%	95,8%	96,2%	95,7%	96,9%	98,1%	97,9%	95,6%	95,8%	66,1%	
IAL-RC31									99,8%	98,4%	99,6%	99,7%	97,3%	99,8%	96,2%	95,5%	99,4%	96,3%	97,2%	99,8%	97,0%	95,8%	96,1%	66,5%	69,6%	95,7%	96,1%	95,6%	96,8%	98,0%	97,8%	95,5%	95,7%	66,0%	
IAL-RC33										98,5%	99,5%	99,6%	99,6%	97,2%	99,7%	96,1%	95,4%	99,3%	96,2%	97,1%	99,7%	96,9%	95,7%	96,0%	66,5%	69,7%	95,6%	96,0%	95,5%	96,7%	97,9%	97,7%	95,4%	95,6%	66,0%
IAL-RC34											98,1%	98,2%	98,2%	95,7%	98,3%	94,7%	94,0%	97,9%	94,8%	95,6%	98,3%	95,4%	94,3%	94,6%	65,8%	69,1%	94,4%	94,6%	95,2%	96,4%	96,2%	94,2%	94,4%	65,3%	
IAL-RC36												99,6%	97,4%	99,7%	96,3%	95,6%	99,3%	96,4%	97,3%	99,7%	97,1%	95,9%	96,2%	66,7%	69,6%	95,8%	96,2%	95,7%	96,9%	98,1%	97,9%	95,6%	95,8%	66,1%	
IAL-RC43													99,7%	97,3%	99,8%	96,2%	95,5%	99,4%	96,3%	97,2%	99,8%	97,0%	95,8%	96,1%	66,8%	69,7%	95,7%	96,1%	95,6%	96,8%	98,0%	97,8%	95,5%	95,7%	66,2%
IAL-RC59														97,3%	99,8%	96,2%	95,5%	99,4%	96,3%	97,2%	99,8%	97,0%	95,8%	96,1%	66,5%	69,5%	95,7%	96,1%	95,6%	96,8%	98,0%	97,8%	95,5%	95,7%	66,0%
Moduganari															97,4%	96,9%	96,3%	97,0%	96,8%	99,4%	97,4%	97,4%	96,7%	97,0%	66,3%	69,8%	96,3%	97,0%	96,4%	97,4%	98,2%	98,3%	96,3%	96,5%	65,9%
Y08-4																96,3%	95,6%	95,5%	96,4%	97,3%	100,0%	97,1%	95,9%	96,2%	66,7%	69,6%	95,8%	96,2%	95,7%	96,9%	98,1%	97,9%	95,6%	95,8%	66,1%
Y06-1																	96,8%	95,9%	95,5%	96,3%	96,1%	96,9%	97,2%	66,4%	70,0%	96,7%	97,2%	96,7%	97,6%	97,0%	96,8%	96,4%	96,2%	66,0%	
Y09-1																		95,2%	95,8%	96,2%	95,6%	96,2%	98,4%	98,7%	66,8%	69,8%	96,1%	98,3%	98,4%	98,1%	96,7%	96,4%	96,5%	96,1%	66,5%
Y11-1																			96,0%	96,9%	99,5%	96,7%	95,5%	95,8%	66,4%	69,6%	95,6%	95,8%	95,3%	96,4%	97,7%	97,5%	95,2%	95,4%	65,9%
CAU10-312																				96,7%	96,4%	97,9%	95,4%	67,0%	70,2%	95,6%	96,2%	95,7%	96,4%	97,5%	97,3%	95,6%	95,6%	66,8%	
Jajeri																																			
YNR001																					97,3%	97,3%	96,5%	96,9%	66,3%	69,3%	96,2%	96,9%	96,3%	97,3%	98,1%	98,2%	96,2%	96,4%	65,9%
BS347																						97,1%	95,9%	96,2%	66,7%	69,6%	95,8%	96,2%	95,7%	96,9%	98,1%	97,9%	95,6%	95,8%	66,1%
OH567																																			
Wu82																																			
Shintoku																																			
Cowden																																			
AS7J																																			
GUP188																																			
CVH001																																			
Z08																																			
BCN9																																			
V508																																			
Belem																																			
Bristol																																			
Toyama																																			

Humano
 Bovino
 Porcino

Figura 55. Matriz de identidade das sequências nucleotídicas parciais do gene VP4 de RVC gerada com o software *BioEdit* (Ibis Therapeutics, EUA). As cepas IAL-RC09, IAL-RC12, IAL-R 22, IAL-RC30, IAL-RC31, IAL-RC33, IAL-RC34, IAL-RC36, IAL-RC43 e IAL-RC59 foram detectadas em pacientes apresentando gastroenterite aguda proveniente da vigilância nacional dos RV entre Junho de 2007 e Junho de 2012. As cepas IAL-RC26 e IAL-RC27 foram detectadas em pacientes apresentando gastroenterite aguda proveniente de um surto na cidade de Valentim Gentil, Estado de São Paulo, em 1993. Sequências VP4 de referência foram obtidas a partir do *GenBank*.

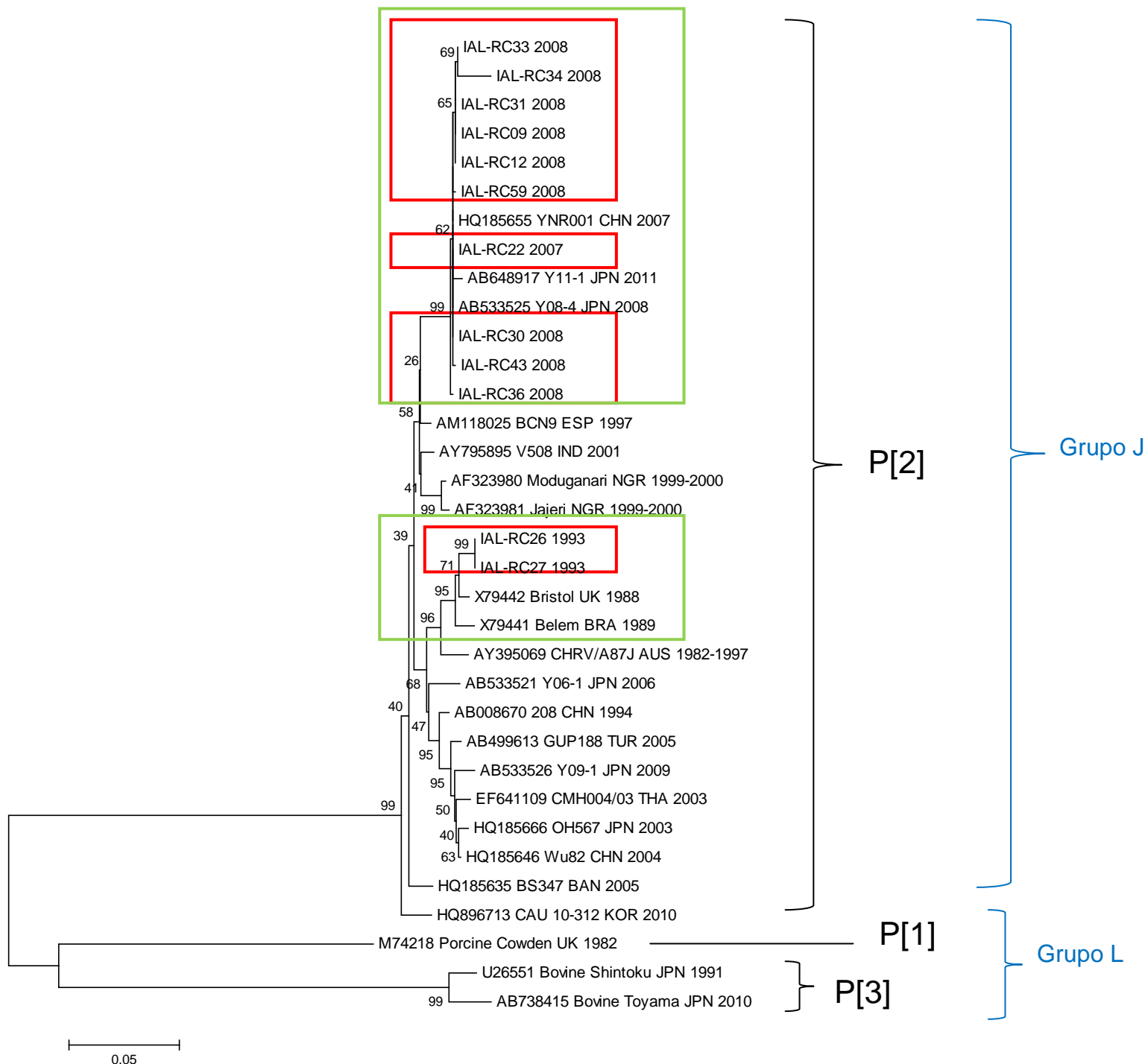


Figura 56. Árvore genealógica do tipo *Neighbor-Joining* (NJ) das sequências nucleotídicas parciais do gene VP4 de RVC das cepas IAL-RC gerada com o software MEGA 4.0. As cepas IAL-RC foram detectadas nos anos de 1993 e 2007/2008 em pacientes apresentando sintomas de gastroenterite aguda provenientes da vigilância nacional dos RV (retângulos vermelhos). Os retângulos verdes destacam as cepas de RVC com maior percentual de similaridade em relação às cepas IAL-RC. Sequências RVC VP4 de referência foram obtidas a partir do *GenBank*. P[1] a P[3] representam os genótipos identificados. J e L representam dois grupos geneticamente diferentes. As espécies e os números de acesso de cada cepa estão indicados. As siglas dos países de cada cepa estão descritas no Anexo 1. A escala indica a diversidade genética. Percentuais dos valores de *bootstrap* estão localizados nos nós dos ramos.

388 390

	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	
IAL-RC09	CKILSEI	IKGGGWG	YDIYSV	IFKTVNH	HSYSTR	AGENVNA	HVVISF	NNIKER	AYGGSL	PTDFK	IGRFD	ILD	DDSVVY	IDYWD	SEIF
IAL-RC12															
IAL-RC22															
IAL-RC26		.	V.				.	V.							
IAL-RC27		.	V.				.	V.			X				
IAL-RC30															
IAL-RC31									X						
IAL-RC33															
IAL-RC34															X
IAL-RC36															.K
IAL-RC43															NMVYVX
IAL-RC59															.K
Moduganari		.	V.				.	V.							
Y08-4															
Y06-1		.	V.			S		.	V.						
Y09-1		.	V.					.	V.						
Y11-1															
CAU 10-312		.	V.					.	V.						
Ja'jari		.	V.					.	V.						
YNR001															
BS347		.	V.					.	V.						
OH567		.	V.					.	V.						
Wu82		.	V.					.	V.						
Shintoku		E	..VV			A	..I								
Cowden		E	..VV			A	..I								
CHRV/A87J		.	V.					.	V.						
GUP188		.	V.					.	V.						
CMH004/03		.	V.					.	V.						
208		.	V.					.	V.						
BCN9		.	V.					.	V.						
V508		.	V.					.	V.						
Belem		.	V.					.	V.						
Bristol		.	V.					.	V.						
Toyama		E	..VV			A	..I								

	430	440	450	460	470	480	490	500	510	520	530	540	550	560
IAL-RC09														
IAL-RC12														
IAL-RC22														
IAL-RC26														
IAL-RC27														
IAL-RC30														
IAL-RC31														
IAL-RC33														
IAL-RC34														
IAL-RC36														
IAL-RC43														
IAL-RC59														
Moduganari														
Y08-4														
Y06-1														
Y09-1														
Y11-1														
CAU 10-312														
Ja'jari														
YNR001														
BS347														
OH567														
Wu82														
Shintoku														
Cowden														
CHRV/A87J														
GUP188														
CMH004/03														
208														
BCN9														
V508														
Belem														
Bristol														
Toyama														



Figura 57. Alinhamento da sequência de aminoácidos deduzida a partir da sequência de nucleotídeos do gene VP4 de RVC entre as cepas IAL-RC09, IAL-RC12, IAL-RC22, IAL-RC26, IAL-RC27, IAL-RC30, IAL-RC31, IAL-RC33, IAL-RC34, IAL-RC36, IAL-RC43 e IAL-RC59 e as cepas protótipos. Os resíduos de lisina (k) localizados nos aminoácidos 231, 239, 244, 247 e 248 estão indicados por asteriscos. O domínio de clivagem está indicado pelo retângulo preto. Os retângulos vermelhos indicam a localização das deleções observadas nas cepas de RVC VP4 animais. As abreviações referentes aos aminoácidos estão listadas no Anexo 2.

	IAL-RC09	IAL-RC12	IAL-RC22	IAL-RC26	IAL-RC27	IAL-RC30	IAL-RC31	IAL-RC33	IAL-RC34	IAL-RC36	IAL-RC43	IAL-RC59	Moduganari	Y08-4	Y06-1	Y09-1	Y11-1	CAU10-312	Jajeri	YNR001	BS347	OH567	Wu82	Shintoku	Cowden	A87J	GUP188	CMH004/03	Z08	BCN9	V508	Belem	Bristol	Toyama		
IAL-RC09		100,0%	99,6%	86,9%	86,9%	99,6%	100,0%	99,6%	97,0%	99,2%	99,6%	99,2%	93,0%	99,6%	89,4%	87,5%	98,5%	89,1%	93,4%	99,6%	91,9%	89,0%	89,4%	31,0%	32,8%	87,3%	89,4%	87,6%	90,5%	94,9%	94,1%	86,8%	87,6%	29,3%		
IAL-RC12				99,6%	86,9%	86,9%	99,6%	100,0%	99,6%	97,0%	99,2%	99,2%	93,0%	99,6%	89,4%	87,5%	98,5%	89,1%	93,4%	99,6%	91,9%	89,0%	89,4%	31,0%	32,8%	87,3%	89,4%	87,6%	90,5%	94,9%	94,1%	86,8%	87,6%	29,3%		
IAL-RC22						100,0%	99,6%	99,2%	96,7%	99,6%	100,0%	99,6%	93,4%	100,0%	89,8%	87,9%	98,9%	89,4%	93,7%	100,0%	92,3%	89,4%	89,7%	31,0%	32,8%	87,6%	89,7%	88,0%	90,8%	95,2%	94,5%	87,2%	88,0%	29,3%		
IAL-RC26					100,0%	87,2%	86,9%	86,5%	84,4%	87,6%	87,2%	86,9%	88,7%	87,2%	88,6%	87,8%	86,5%	86,2%	88,3%	87,2%	88,0%	88,6%	88,9%	32,3%	32,7%	91,2%	88,9%	87,2%	90,4%	90,5%	89,8%	94,1%	95,6%	31,6%		
IAL-RC27						87,2%	86,9%	86,5%	84,4%	87,6%	87,2%	86,9%	88,7%	87,2%	88,6%	87,8%	86,5%	86,2%	88,3%	87,2%	88,0%	88,6%	88,9%	32,3%	32,7%	91,2%	88,9%	87,2%	90,4%	90,5%	89,8%	94,1%	95,6%	31,6%		
IAL-RC30							99,6%	99,2%	96,7%	99,6%	100,0%	99,6%	93,4%	100,0%	89,8%	87,9%	98,9%	89,4%	93,7%	100,0%	92,3%	89,4%	89,7%	31,0%	32,8%	87,6%	89,7%	88,0%	90,8%	95,2%	94,5%	87,2%	88,0%	29,3%		
IAL-RC31								99,6%	97,0%	99,2%	99,6%	99,2%	93,0%	99,6%	89,4%	87,5%	98,5%	89,1%	93,4%	99,6%	91,9%	89,0%	89,4%	31,0%	32,8%	87,3%	89,4%	87,6%	90,5%	94,9%	94,1%	86,8%	87,6%	29,3%		
IAL-RC33									97,4%	98,9%	99,2%	98,9%	92,7%	99,2%	89,0%	87,2%	98,1%	88,7%	93,0%	99,2%	91,6%	88,7%	89,0%	31,0%	32,8%	86,9%	89,0%	87,3%	90,1%	94,5%	93,7%	86,4%	87,2%	29,3%		
IAL-RC34										96,3%	96,7%	96,3%	90,1%	96,7%	86,5%	84,7%	95,6%	86,2%	90,5%	96,7%	89,0%	86,2%	86,5%	30,3%	32,5%	84,8%	86,5%	85,1%	87,6%	92,0%	91,2%	84,3%	85,1%	28,6%		
IAL-RC36											99,6%	99,2%	93,7%	99,6%	90,1%	88,3%	98,5%	89,8%	94,1%	99,6%	92,7%	89,8%	90,1%	31,3%	33,2%	88,0%	90,1%	88,4%	91,2%	95,6%	94,8%	87,5%	88,3%	29,6%		
IAL-RC43												99,6%	93,4%	100,0%	89,8%	87,9%	98,9%	89,4%	93,7%	100,0%	92,3%	89,4%	89,7%	31,0%	32,8%	87,6%	89,7%	88,0%	90,8%	95,2%	94,5%	87,2%	88,0%	29,3%		
IAL-RC59													93,0%	99,6%	89,4%	87,9%	98,5%	89,1%	93,4%	99,6%	91,9%	89,0%	89,4%	30,6%	32,5%	87,3%	89,4%	87,6%	90,5%	94,9%	94,1%	86,8%	87,6%	29,0%		
Moduganari															93,4%	90,5%	89,4%	92,3%	90,2%	98,9%	93,4%	93,0%	90,9%	91,2%	31,0%	33,5%	88,7%	91,2%	89,4%	92,3%	96,0%	96,3%	89,0%	89,4%	29,6%	
Y08-4																89,8%	87,9%	98,9%	89,4%	93,7%	100,0%	92,3%	89,4%	89,7%	31,0%	32,8%	87,6%	89,7%	88,0%	90,8%	95,2%	94,5%	87,2%	88,0%	29,3%	
Y06-1																	90,4%	88,7%	86,6%	90,1%	89,8%	89,8%	91,2%	91,5%	31,1%	32,5%	90,1%	91,5%	89,8%	93,0%	91,6%	90,9%	89,3%	88,6%	29,7%	
Y09-1																																				
Y11-1																																				
CAU10-312																																				
Jajeri																																				
YNR001																																				
BS347																																				
OH567																																				
Wu82																																				
Shintoku																																				
Cowden																																				
A87J																																				
GUP188																																				
CMH001																																				
Z08																																				
BCN9																																				
V508																																				
Belem																																				
Bristol																																				
Toyama																																				

Humano
Bovino
Porcino

Figura 58. Matriz de identidade das sequências deduzidas de aminoácidos a partir das sequências nucleotídicas parciais do gene VP4 de RVC gerada com o software *BioEdit* (Ibis Therapeutics, EUA). As cepas IAL-RC09, IAL-RC12, IAL-RC22, IAL-RC30, IAL-RC 31, IAL-RC33, IAL-RC34, IAL-RC36, IAL-RC43 e IAL-RC59 foram detectadas em pacientes apresentando gastroenterite aguda proveniente da vigilância nacional dos RV entre Junho de 2007 e Junho de 2012. As cepas IAL-RC26 e IAL-RC27 foram detectadas em pacientes apresentando gastroenterite aguda proveniente de um surto na cidade de Valentim Gentil, Estado de São Paulo, em 1993. Sequências VP4 de referência foram obtidas a partir do *GenBank*.

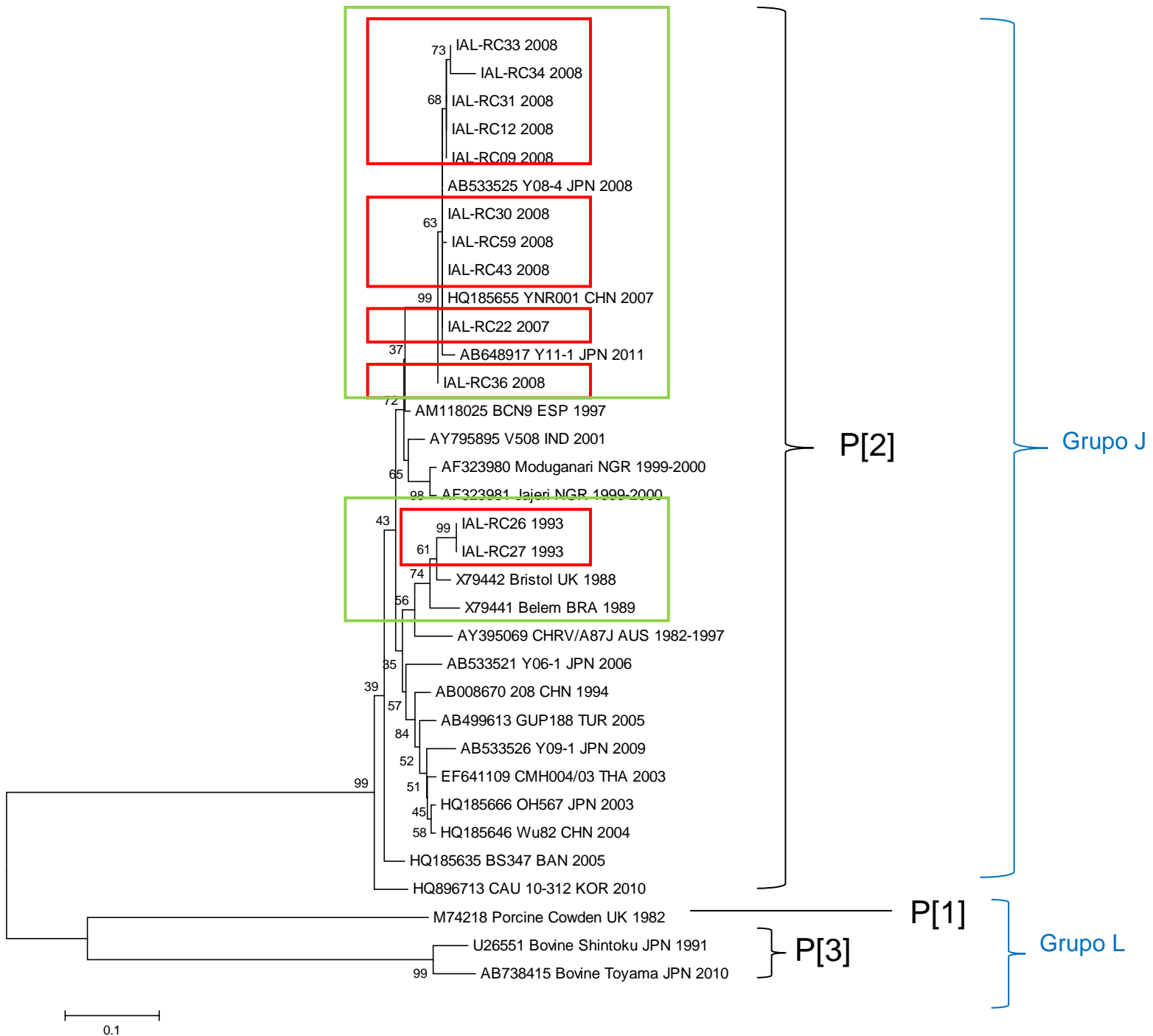


Figura 59. Árvore genealógica do tipo *Neighbor-Joining* (NJ) das sequências de aminoácidos deduzidas a partir das sequências nucleotídicas parciais do gene VP4 de RVC das cepas IAL-RC gerada com o software MEGA 4.0. As cepas IAL-RC foram detectadas nos anos de 1993 e 2007/2008 em pacientes apresentando sintomas de gastroenterite aguda provenientes da vigilância nacional dos RV (retângulos vermelhos). Os retângulos verdes destacam as cepas de RVC com maior percentual de similaridade em relação às cepas IAL-RC. Sequências RVC VP4 de referência foram obtidas a partir do *GenBank*. P[1] a P[3] representam os genótipos identificados. As espécies e os números de acesso de cada cepa estão indicados. As siglas dos países de cada cepa estão descritas no Anexo 1. A escala indica a diversidade genética. Percentuais dos valores de *bootstrap* estão localizados nos nós dos ramos.

4.2.4.4 Proteína NSP4 – Gene 11

Os produtos das sequências de nucleotídeos obtidas para as cepas RVC NSP4 foram de: 462pb (nucleotídeos 33-495 para a cepa IAL-RC01, 519pb (nucleotídeos 1-520) para a cepa IAL-RC09, 501pb (nucleotídeos 19-520) para a cepa IAL-RC12, 494pb (nucleotídeos 27-521) para a cepa IAL-RC22, 476pb (nucleotídeos 35-511) para a cepa IAL-RC26, 486pb (nucleotídeos 35-521) para a cepa IAL-RC27, 487pb (nucleotídeos 34-521) para a cepa IAL-RC30, 450pb (nucleotídeos 34-484) para a cepa IAL-RC31, 519pb (nucleotídeos 1-520) para a cepa IAL-RC32, 544pb (nucleotídeos 1-545) para a cepa IAL-RC33, 463pb (nucleotídeos 39-502) para a cepa IAL-RC34, 520pb (nucleotídeos 1-521) para a cepa IAL-RC35, 457pb (nucleotídeos 34-491) para a cepa IAL-RC36, 504pb (nucleotídeos 17-521) para a cepa IAL-RC43 e 451pb (nucleotídeos 45-496) para a cepa IAL-RC59. Para as análises de identidade, comparação com as cepas protótipos e construção da árvore genealógica foram utilizadas sequências com 409pb.

No dendrograma construído com as sequências parciais do gene NSP4 (Figura 61), todas as cepas humanas de RVC, incluindo àquelas analisadas no presente estudo, agruparam em um único genótipo, E2, de acordo com o sistema de classificação proposto por Yamamoto et al. (2011). Todas as cepas animais utilizadas como referências tiveram seu genótipo identificado: E1 para as cepas porcinas Cowden (AF093202), RV0104 (KC164673) e RV0143 (KC164676), e E3 para as cepas bovinas Shintoku (AB738404) e Toyama (AB738410).

As cepas humanas IAL-RC detectadas em 2007-2008 (IAL-RC01, IAL-RC09, IAL-RC12, IAL-RC22, IAL-RC30-36, IAL-RC43 e IAL-RC59) exibiram alta similaridade nucleotídica e de aminoácidos com as cepas humanas asiáticas BK0830 e YNR001, isoladas no Japão em 2008 e na China em 2007, respectivamente (97,2-99,7% nt; 91,8-99% aa) (Figura 60, Figura 61, Figura 63 e Figura 64). Por outro lado, as cepas humanas IAL-RC26 e IAL-RC27 detectadas em 1993, exibiram maior identidade nucleotídica e de aminoácidos com a cepa humana protótipo Bristol isolada no Reino Unido em 1988 e com a cepa humana

chinesa 208 detectada em 1995 (98,3-98,5% nt; 90,8-98,1% aa) (Figura 60, Figura 61, Figura 63 e Figura 64).

As cepas NSP4 IAL-RC apresentaram alta identidade nucleotídica quando comparadas entre si (93,3-100% nt; 82,3-100% aa). Entretanto, apresentaram uma similaridade variando de baixa a alta (71,1-99,7% nt; 29-99% aa) quando comparadas com as demais cepas humanas RVC protótipos. De fato, a árvore filogenética do gene NSP4 mostrou que as cepas humanas se agruparam em dois subgrupos (ou linhagens) distintos. Um subgrupo, denominado neste estudo como subgrupo II, é composto exclusivamente por cepas humanas brasileiras de NSP4 RVC isoladas em 1997 e 2003-2004 (valor de bootstrap 100%), as quais apresentaram um baixo valor de similaridade com outras cepas humanas de RVC (72,1-75,1% nt; 29-36% aa), incluindo as cepas IAL-RC analisadas no presente estudo (71,1-74,8% nt, 29-35,2% aa). O outro subgrupo, denominado neste estudo como subgrupo I, é composto por cepas humanas brasileiras de NSP4 RVC detectadas em 1993 e 2007-2008, as quais formam um cluster com as demais cepas humanas protótipos (valor de bootstrap 100%). As cepas humanas IAL-RC exibiram baixa identidade nucleotídica com cepas RVC NSP4 animais, tanto de origem porcina (65-68,4% nt; 28,5-34,9% aa), quanto bovina (60,8-62,1% nt; 23,5-27% aa) (Figura 60, Figura 61 e Figura 63). A Figura 61 também permite observar que as cepas RVC analisadas estão divididas em dois grupos geneticamente diferentes, denominados nesse estudo M e N. O grupo M é composto exclusivamente por cepas humanas, enquanto o grupo N possui apenas cepas de origem animal.

A sequência de aminoácidos deduzida a partir das cepas IAL-RC01, IAL-RC09, IAL-RC12, IAL-RC22, IAL-RC26, IAL-RC27, IAL-RC30-36, IAL-RC43 e IAL-RC59 foi determinada e comparada com as cepas de RVC NSP4 protótipos (Figura 62). A sequência completa do gene RVC NSP4 em cepas de origem humana e porcina consiste em 613 nucleotídeos e contém uma única ORF composta por 450pb (150 aa) localizada entre os nucleotídeos 39 e 488 (Horie et al., 1997; Soma et al., 2013). A sequência completa do gene RVC NSP4 em cepas de origem bovina ainda não foi totalmente determinada e apenas a ORF de 146 aminoácidos

pode ser elucidada (Soma et al., 2013). O alinhamento da sequência de aminoácidos deduzida a partir do gene NSP4 revelou a existência de duas deleções (2 aminoácidos na posição 130-131 e 2 aminoácidos na posição 138-139) nas cepas de origem bovina quando comparadas com cepas de origem humana e porcina (Figura 62).

Os sítios potenciais de glicosilação N estão localizados nos aminoácidos 5-7 (NQT), 32-34 (NGS), 65-67 (NNS), 70-72 (NTT) e 134-136 (NDT) (Horie et al. 1997). Os sítios NQT (aminoácidos 5-7) e NGS (aminoácidos 32-34) estão presentes em todas as cepas IAL-RC sequenciadas nesse estudo. O sítio NNS (aminoácidos 65-67) encontra-se na posição 66-68 devido à deleção ocorrida no aminoácido 61 observada nas cepas RVC humanas quando comparadas às cepas RVC animais. Ainda, o mesmo sítio NNS (aminoácidos 66-68) foi substituído pelo sítio>NNL (aminoácidos 66-68) nas amostras IAL-RC01, IAL-RC09, IAL-RC12, IAL-RC30-34, IAL-RC36, IAL-RC43 e IAL-RC59 detectadas em 2007-2008. Essa substituição é compartilhada pelas cepas humanas YNR001, BK0830, W82, OH567, GUP188 e Nsk09-B43 detectadas na China, Japão, Turquia e Rússia entre 2001 e 2009. As cepas IAL-RC26 e IAL-RC27 detectadas em 1993 apresentaram o sítio NDS na posição entre os aminoácidos 66-68, enquanto a cepa IAL-RC35, detectada em 2008, apresentou o sítio>NNF (aminoácido 66-68) (Figura 62).

O sítio NTT (aminoácidos 70-72) encontra-se na posição 71-73 e é constituído por NTK em todas as cepas humanas analisadas, incluindo as cepas IAL-RC detectadas no presente estudo. A única exceção é a cepa humana Ehime9301, isolada no Japão em 1993, a qual apresenta o sítio NTT. O sítio NDT (aminoácidos 134-136) encontra-se na posição 135-137 e está conservado nas cepas humanas IAL-RC01, IAL-RC09, IAL-RC12, IAL-RC22, IAL-RC30-36, IAL-RC43 e IAL-RC59 detectadas em 2007-2008. As cepas IAL-RC26 e IAL-RC27, isoladas em 1993, possuem a combinação exclusiva NDA. Somente os sítios potenciais de glicosilação N NQT (aminoácidos 5-7) e NGS (aminoácidos 32-34) estão mantidos nas cepas NSP4 RVC de origem animal (Figura 62).

A proteína NSP4 dos RVC apresenta dois domínios hidrofóbicos na porção amino-terminal: H2 (aminoácidos 20-32) e H3 (aminoácidos 39-51) (Horie et al.,

1997; Sasaki et al., 2001). Esses domínios apresentam-se conservados em todas as cepas humanas, entretanto, o mesmo não é observado nas cepas de origem suína e bovina. O alinhamento da sequência de aminoácidos deduzida a partir do gene NSP4 revelou a existência de substituições nas cepas humanas IAL-RC nas posições: 49^{H→N} (localizado dentro do domínio hidrofóbico H3), 59^{D→G} e 76^{H→Q}. Curiosamente, essas substituições não foram observadas nas cepas humanas IAL-RC26 e IAL-RC27 detectadas no surto ocorrido na cidade de Valentim Gentil em 1993 (Figura 62).

A árvore genealógica construída a partir da sequência deduzida de aminoácidos (Figura 64) permite observar que as relações genéticas entre as cepas IAL-RC01, 09, IAL-RC12, IAL-RC22, IAL-RC26, IAL-RC27, IAL-RC30-36, IAL-RC43 e IAL-RC59 e as demais cepas protótipos estão mantidas. A Figura 64 também evidencia os dois grupos geneticamente distintos, denominados neste estudo como J e L, e os subgrupos I e II, da mesma forma que foram destacados na Figura 61.

	IAL-RC01	IAL-RC09	IAL-RC12	IAL-RC22	IAL-RC26	IAL-RC27	IAL-RC30	IAL-RC31	IAL-RC32	IAL-RC33	IAL-RC34	IAL-RC35	IAL-RC36	IAL-RC43	IAL-RC59	YNR001	BK0830	Vu62	OH667	GUP188	Ehime	Nsk09	Omsk08	V508	Bristol	BS347	Z08	10-312	1154	10007	6632	7946	6325	Shintoku	Toyama	Cowden	RV0104	RV0143						
IAL-RC01		99,7%	99,7%	99,2%	93,3%	93,3%	99,5%	99,5%	99,7%	99,7%	99,7%	99,7%	99,0%	98,7%	99,0%	99,0%	97,7%	97,0%	96,7%	96,0%	95,0%	94,8%	94,8%	94,5%	94,3%	93,5%	93,5%	93,3%	73,1%	74,3%	74,3%	74,3%	74,3%	74,3%	61,8%	61,6%	65,5%	67,9%	67,4%					
IAL-RC09			100,0%	99,5%	93,5%	93,5%	99,7%	99,7%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	99,2%	99,0%	99,2%	99,2%	98,0%	97,2%	97,0%	96,3%	95,3%	95,0%	95,0%	94,8%	94,5%	93,8%	93,8%	93,5%	73,3%	74,6%	74,6%	74,6%	74,6%	74,6%	61,8%	61,8%	65,7%	68,2%	67,7%					
IAL-RC12				99,5%	93,5%	93,5%	99,7%	99,7%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	99,2%	99,0%	99,2%	99,2%	98,0%	97,2%	97,0%	96,3%	95,3%	95,0%	95,0%	94,8%	94,5%	93,8%	93,8%	93,5%	73,3%	74,6%	74,6%	74,6%	74,6%	74,6%	61,8%	61,8%	65,7%	68,2%	67,7%					
IAL-RC22					94,0%	94,0%	99,2%	99,2%	99,5%	99,5%	99,5%	99,5%	98,7%	99,5%	99,7%	99,7%	98,5%	97,7%	97,5%	96,7%	95,8%	95,0%	95,0%	94,8%	95,0%	93,8%	93,8%	93,5%	73,8%	74,6%	74,6%	74,6%	74,6%	74,6%	61,8%	61,6%	65,2%	67,7%	67,2%					
IAL-RC26						99,5%	99,8%	99,8%	99,5%	99,5%	99,5%	99,5%	92,8%	94,0%	93,8%	94,3%	95,0%	95,8%	95,3%	95,8%	94,5%	95,0%	94,8%	98,5%	94,0%	95,3%	93,8%	93,8%	71,1%	71,9%	71,9%	71,9%	71,9%	71,9%	60,8%	61,1%	65,0%	66,7%	68,2%					
IAL-RC27							99,8%	99,8%	99,5%	99,5%	99,5%	99,5%	92,8%	94,0%	93,8%	94,3%	95,5%	95,8%	95,3%	95,8%	94,5%	95,0%	94,8%	98,5%	94,0%	95,3%	93,8%	93,8%	71,6%	72,1%	72,1%	72,1%	72,1%	72,1%	61,3%	61,6%	65,0%	66,7%	68,4%					
IAL-RC30								100,0%	99,7%	99,7%	99,7%	99,7%	99,0%	99,2%	99,0%	99,0%	97,7%	97,0%	96,7%	96,3%	95,0%	94,8%	94,8%	94,5%	94,8%	93,5%	94,0%	93,3%	73,1%	74,3%	74,3%	74,3%	74,3%	74,3%	61,6%	62,1%	66,0%	67,9%	67,9%					
IAL-RC31									99,7%	99,7%	99,7%	99,7%	99,0%	99,2%	99,0%	99,0%	97,7%	97,0%	96,7%	96,3%	95,0%	94,8%	94,8%	94,5%	94,8%	93,5%	94,0%	93,3%	73,1%	74,3%	74,3%	74,3%	74,3%	74,3%	61,6%	62,1%	66,0%	67,9%	67,9%					
IAL-RC32										100,0%	100,0%	100,0%	99,2%	99,0%	99,2%	99,2%	98,0%	97,2%	97,0%	96,3%	95,3%	95,0%	95,0%	94,8%	94,5%	93,8%	93,8%	93,5%	73,3%	74,6%	74,6%	74,6%	74,6%	74,6%	61,8%	61,8%	65,7%	68,2%	67,7%					
IAL-RC33											100,0%	100,0%	99,2%	99,0%	99,2%	99,2%	98,0%	97,2%	97,0%	96,3%	95,3%	95,0%	95,0%	94,8%	94,5%	93,8%	93,8%	93,5%	73,3%	74,6%	74,6%	74,6%	74,6%	74,6%	61,8%	61,8%	65,7%	68,2%	67,7%					
IAL-RC34												100,0%	99,2%	99,0%	99,2%	99,2%	98,0%	97,2%	97,0%	96,3%	95,3%	95,0%	95,0%	94,8%	94,5%	93,8%	93,8%	93,5%	73,3%	74,6%	74,6%	74,6%	74,6%	74,6%	61,8%	61,8%	65,7%	68,2%	67,7%					
IAL-RC35													99,2%	99,0%	99,2%	99,2%	98,0%	97,2%	97,0%	96,3%	95,3%	95,0%	95,0%	94,8%	94,5%	93,8%	93,8%	93,5%	73,3%	74,6%	74,6%	74,6%	74,6%	74,6%	61,8%	61,8%	65,7%	68,2%	67,7%					
IAL-RC36													98,2%	98,5%	98,5%	97,2%	96,5%	95,3%	95,5%	94,5%	94,3%	94,3%	94,0%	94,0%	93,8%	93,1%	93,1%	92,8%	72,9%	74,1%	74,1%	74,1%	74,1%	74,1%	62,1%	62,1%	66,2%	68,4%	68,2%					
IAL-RC43															99,2%	99,2%	98,0%	97,2%	97,0%	96,7%	95,3%	94,5%	94,5%	94,3%	95,0%	93,3%	93,8%	93,1%	73,3%	74,1%	74,1%	74,1%	74,1%	74,1%	61,3%	61,8%	65,2%	67,2%	67,2%					
IAL-RC59																99,5%	98,2%	97,5%	97,2%	96,5%	95,5%	94,8%	94,8%	94,5%	94,8%	93,5%	93,5%	93,3%	74,1%	74,8%	74,8%	74,8%	74,8%	74,8%	61,3%	61,3%	65,5%	67,4%	66,9%					
YNR001																	98,7%	98,0%	97,7%	97,0%	96,0%	95,3%	95,3%	94,8%	94,8%	94,5%	94,0%	94,0%	93,8%	74,1%	74,8%	74,8%	74,8%	74,8%	74,8%	61,8%	61,8%	65,5%	67,9%	67,4%				
BK0830																		98,7%	98,0%	97,7%	97,0%	96,0%	95,3%	95,3%	94,8%	94,8%	94,5%	94,0%	94,0%	93,8%	74,1%	74,8%	74,8%	74,8%	74,8%	74,8%	61,8%	61,8%	65,5%	67,9%	67,4%			
Vu62																			98,7%	98,0%	97,7%	97,0%	96,0%	95,3%	95,3%	94,8%	94,8%	94,5%	94,0%	94,0%	93,8%	74,1%	74,8%	74,8%	74,8%	74,8%	74,8%	61,8%	61,8%	65,5%	67,9%	67,4%		
OH667																				98,7%	98,0%	97,7%	97,0%	96,0%	95,3%	95,3%	94,8%	94,8%	94,5%	94,0%	94,0%	93,8%	74,1%	74,8%	74,8%	74,8%	74,8%	74,8%	61,8%	61,8%	65,5%	67,9%	67,4%	
GUP188																					98,7%	98,0%	97,7%	97,0%	96,0%	95,3%	95,3%	94,8%	94,8%	94,5%	94,0%	94,0%	93,8%	74,1%	74,8%	74,8%	74,8%	74,8%	74,8%	61,8%	61,8%	65,5%	67,9%	67,4%
Ehime																						96,0%	96,3%	96,3%	96,0%	96,3%	95,0%	95,5%	94,8%	74,1%	74,3%	74,3%	74,3%	74,3%	74,3%	63,0%	62,8%	65,7%	67,2%	67,7%				
Nsk09																						95,8%	96,3%	96,0%	96,7%	95,0%	95,5%	94,8%	72,4%	73,1%	73,1%	73,1%	73,1%	73,1%	61,6%	61,6%	65,2%	67,7%	68,2%					
Omsk08																								99,5%	98,7%	95,5%	97,2%	95,3%	97,0%	73,1%	75,1%	75,1%	75,1%	75,1%	75,1%	62,1%	61,6%	64,7%	67,2%	67,2%				
V508																									99,2%	96,0%	97,7%	95,8%	97,9%	72,9%	74,8%	74,8%	74,8%	74,8%	74,8%	74,8%	62,1%	61,6%	64,7%	67,2%	67,2%			
Bristol																																												
BS347																																												
Z08																																												
10-312																																												
1154																																												
10007																																												
6632																																												
7946																																												
6325																																												
Shintoku																																												
Toyama																																												
Cowden																																												
RV0104																																												
RV0143																																												

 Humano
 Bovino
 Porcino

Figura 60. Matriz de identidade das seqüências nucleotídicas parciais do gene NSP4 de RVC gerada com o software *BioEdit* (Ibis Therapeutics, EUA). As cepas IAL-RC01, IAL-RC09, IAL-RC12, IAL-RC22, IAL-RC30-36, IAL-RC43 e IAL-RC59 foram detectadas em pacientes apresentando gastroenterite aguda proveniente da vigilância nacional dos RV entre Junho de 2007 e Junho de 2012. As cepas IAL-RC26 e IAL-RC27 foram detectadas em pacientes apresentando gastroenterite aguda proveniente de um surto na cidade de Valentim Gentil, Estado de São Paulo, em 1993. Sequências NSP4 de referência foram obtidas a partir do *GenBank*.

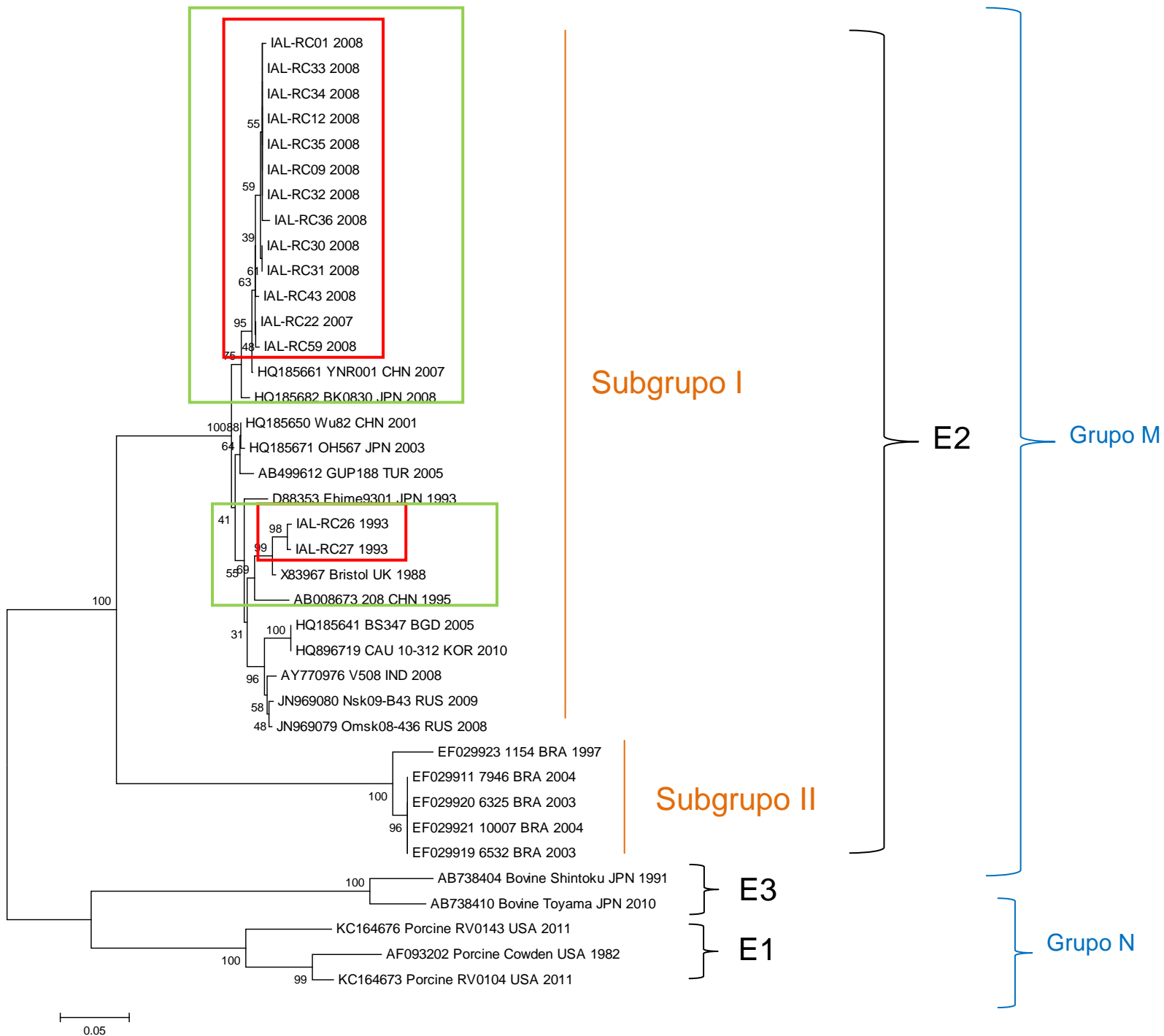


Figura 61. Árvore genealógica do tipo *Neighbor-Joining* (NJ) das sequências nucleotídicas parciais do gene NSP4 de RVC das cepas IAL-RC gerada com o software MEGA 4.0. As cepas IAL-RC foram detectadas nos anos de 1993 e 2007/2008 em pacientes apresentando sintomas de gastroenterite aguda provenientes da vigilância nacional dos RV (retângulos vermelhos). Os retângulos verdes destacam as cepas de RVC com maior percentual de similaridade em relação às cepas IAL-RC. Sequências RVC NSP4 de referência foram obtidas a partir do *GenBank*. E1 a E3 representam os genótipos identificados. M e N representam dois grupos geneticamente diferentes. I e II representam dois subgrupos geneticamente distintos. As espécies e os números de acesso de cada cepa estão indicados. As siglas dos países de cada cepa estão descritas no Anexo 1. A escala indica a diversidade genética. Percentuais dos valores de *bootstrap* estão localizados nos nós dos ramos.



Figura 62. Alinhamento da sequência de aminoácidos deduzida a partir da sequência de nucleotídeos do gene NSP4 de RVC entre as cepas IAL-RC01, IAL-RC09, IAL-RC12, IAL-RC22, IAL-RC26, IAL-RC27, IAL-RC30-36, IAL-RC43 e IAL-RC59 e as cepas protótipos. Os domínios hidrofóbicos H2 e H3 estão indicados. Os cinco sítios de glicosilação N localizados nos aminoácidos 5-7 (NQT), 32-34 (NGS), 65-67 (NNS), 70-72 (NTT) e 134-136 (NDT) estão indicados por asteriscos. As abreviações referentes aos aminoácidos estão listadas no Anexo 2.

	IAL-RC01	IAL-RC09	IAL-RC12	IAL-RC22	IAL-RC26	IAL-RC27	IAL-RC30	IAL-RC31	IAL-RC32	IAL-RC33	IAL-RC34	IAL-RC35	IAL-RC36	IAL-RC38	IAL-RC39	YNRC01	BK080	W62	CH67	GLP188	Bhine	N609	Oms08	V08	Bistd	B637	Z08	10312	1154	1007	662	796	625	Shintoku	Toyama	Cowden	RU004	RU048		
IAL-RC01	100%	100%	98.1%	83.1%	82.3%	99.0%	99.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	98.1%	97.2%	97.2%	97.2%	92.7%	90.0%	89.1%	86.6%	87.6%	83.3%	84.0%	84.0%	83.1%	80.8%	82.3%	80.0%	33.0%	34.4%	34.4%	34.4%	34.4%	26.8%	24.5%	23.3%	34.1%	34.6%			
IAL-RC09		100%	98.1%	83.1%	82.3%	99.0%	99.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	98.1%	97.2%	97.2%	97.2%	92.7%	90.0%	89.1%	86.6%	87.6%	83.3%	84.0%	84.0%	83.1%	80.8%	82.3%	80.0%	33.0%	34.4%	34.4%	34.4%	34.4%	26.8%	24.5%	23.3%	34.1%	34.6%			
IAL-RC12			100%	98.1%	83.1%	82.3%	99.0%	99.0%	100.0%	100.0%	100.0%	98.1%	97.2%	97.2%	97.2%	92.7%	90.0%	89.1%	86.6%	87.6%	83.3%	84.0%	84.0%	83.1%	80.8%	82.3%	80.0%	33.0%	34.4%	34.4%	34.4%	34.4%	26.8%	24.5%	23.3%	34.1%	34.6%			
IAL-RC22				100%	84.9%	84.0%	97.2%	97.2%	98.1%	98.1%	98.1%	98.1%	96.3%	99.0%	99.0%	99.0%	94.5%	91.8%	90.9%	88.3%	88.3%	83.3%	84.0%	84.0%	84.9%	80.8%	82.3%	80.0%	33.8%	35.2%	35.2%	35.2%	26.8%	24.5%	28.5%	33.3%	33.8%			
IAL-RC26					100%	89.0%	88.9%	83.1%	83.1%	83.1%	83.1%	83.1%	81.4%	85.7%	84.0%	85.8%	88.3%	90.9%	90.0%	89.0%	91.8%	87.5%	88.2%	88.2%	93.1%	85.8%	91.7%	84.9%	29.0%	30.3%	30.3%	30.3%	30.3%	25.4%	23.5%	30.1%	33.0%	36.0%		
IAL-RC27						100%	88.0%	82.3%	82.3%	82.3%	82.3%	80.5%	84.8%	83.1%	84.9%	88.2%	89.0%	88.1%	90.9%	88.1%	90.9%	86.6%	87.3%	87.3%	97.2%	84.9%	90.8%	84.0%	29.8%	30.3%	30.3%	30.3%	30.3%	25.4%	24.3%	29.3%	32.2%	35.2%		
IAL-RC30							100%	99.0%	99.0%	99.0%	99.0%	97.2%	98.1%	96.3%	96.3%	91.8%	89.1%	88.2%	87.3%	86.7%	82.4%	82.4%	83.1%	83.1%	88.9%	80.0%	83.0%	73.1%	32.2%	33.6%	33.6%	33.6%	33.6%	26.0%	24.7%	29.6%	33.3%	34.9%		
IAL-RC31								100%	99.0%	99.0%	99.0%	99.0%	97.2%	98.1%	96.3%	96.3%	91.8%	89.1%	88.2%	87.3%	86.7%	82.4%	82.4%	83.1%	83.1%	88.9%	80.0%	83.0%	73.1%	32.2%	33.6%	33.6%	33.6%	33.6%	26.0%	24.7%	29.6%	33.3%	34.9%	
IAL-RC32									100%	100.0%	100.0%	100.0%	98.1%	97.2%	97.2%	97.2%	92.7%	90.0%	89.1%	86.6%	87.6%	83.3%	84.0%	84.0%	83.1%	80.8%	82.3%	80.0%	33.0%	34.4%	34.4%	34.4%	34.4%	26.8%	24.5%	23.3%	34.1%	34.6%		
IAL-RC33										100%	100.0%	100.0%	98.1%	97.2%	97.2%	97.2%	92.7%	90.0%	89.1%	86.6%	87.6%	83.3%	84.0%	84.0%	83.1%	80.8%	82.3%	80.0%	33.0%	34.4%	34.4%	34.4%	34.4%	26.8%	24.5%	23.3%	34.1%	34.6%		
IAL-RC34											100%	100.0%	98.1%	97.2%	97.2%	97.2%	92.7%	90.0%	89.1%	86.6%	87.6%	83.3%	84.0%	84.0%	83.1%	80.8%	82.3%	80.0%	33.0%	34.4%	34.4%	34.4%	34.4%	26.8%	24.5%	23.3%	34.1%	34.6%		
IAL-RC35												100%	98.1%	97.2%	97.2%	97.2%	92.7%	90.0%	89.1%	86.6%	87.6%	83.3%	84.0%	84.0%	83.1%	80.8%	82.3%	80.0%	33.0%	34.4%	34.4%	34.4%	34.4%	26.8%	24.5%	23.3%	34.1%	34.6%		
IAL-RC36													100%	95.4%	95.4%	95.4%	90.9%	88.2%	87.3%	84.8%	85.8%	81.5%	82.3%	82.3%	81.4%	73.1%	80.5%	78.2%	32.2%	33.6%	33.6%	33.6%	33.6%	27.0%	24.7%	29.6%	34.4%	34.6%		
IAL-RC38														100%	98.1%	98.1%	93.6%	90.9%	90.0%	88.1%	88.4%	82.4%	83.1%	83.1%	85.7%	80.0%	83.0%	73.1%	33.0%	34.4%	34.4%	34.4%	34.4%	26.0%	24.7%	28.8%	32.5%	34.1%		
IAL-RC39															100%	98.1%	98.1%	93.6%	90.9%	90.0%	87.5%	88.4%	82.4%	83.1%	83.1%	84.0%	80.0%	81.4%	33.8%	35.2%	35.2%	35.2%	26.8%	24.5%	28.5%	33.3%	33.8%			
YNRC01																100%	95.4%	92.7%	91.8%	88.2%	90.2%	84.2%	84.9%	84.9%	85.8%	81.7%	83.1%	80.8%	34.6%	36.0%	36.0%	36.0%	36.0%	26.8%	24.5%	28.5%	33.3%	33.8%		
BK080																	100%	95.4%	94.5%	91.8%	91.0%	86.7%	87.5%	87.5%	88.3%	84.2%	85.7%	83.3%	34.1%	34.7%	34.7%	34.7%	34.7%	27.8%	25.6%	27.2%	31.9%	32.5%		
W62																		100%	96.3%	91.8%	90.0%	90.9%	90.9%	90.9%	87.5%	88.1%	86.6%	32.7%	34.1%	34.1%	34.1%	34.1%	29.1%	25.2%	28.8%	31.9%	32.7%			
CH67																			100%	90.9%	90.9%	91.8%	90.0%	90.0%	86.6%	87.2%	85.7%	32.7%	34.1%	34.1%	34.1%	34.1%	29.1%	25.2%	28.8%	31.9%	32.7%			
GLP188																				100%	88.3%	88.2%	89.0%	89.0%	89.0%	85.7%	88.1%	84.8%	33.6%	33.3%	33.3%	33.3%	33.3%	30.0%	27.1%	29.6%	31.7%	33.6%		
Bhine																					100%	88.4%	88.2%	88.2%	91.8%	85.9%	89.1%	85.0%	32.2%	33.6%	33.6%	33.6%	33.6%	25.2%	23.1%	28.3%	33.0%	35.7%		
N609																						100%	97.2%	87.5%	92.0%	87.5%	91.1%	33.3%	34.7%	34.7%	34.7%	34.7%	27.0%	23.1%	28.3%	32.2%	32.2%			
Oms08																							100%	98.1%	88.2%	92.8%	88.2%	91.9%	32.5%	33.8%	33.8%	33.8%	33.8%	27.2%	23.3%	27.5%	31.4%	31.4%		
V08																								100%	88.2%	92.8%	88.2%	91.9%	33.3%	34.7%	34.7%	34.7%	34.7%	26.4%	22.5%	26.7%	30.6%	30.6%		
Bistd																									100%	85.8%	91.7%	84.9%	29.0%	30.3%	30.3%	30.3%	30.3%	25.4%	23.5%	29.3%	32.2%	35.2%		
B637																										100%	85.8%	99.1%	30.8%	32.2%	32.2%	32.2%	32.2%	26.2%	23.1%	26.7%	31.4%	29.8%		
Z08																											100%	84.9%	32.2%	31.1%	31.1%	31.1%	31.1%	27.0%	25.2%	28.5%	32.2%	33.6%		
10312																												100%	30.8%	32.2%	32.2%	32.2%	32.2%	26.2%	23.1%	26.7%	31.4%	29.8%		
1154																													100%	89.8%	89.8%	89.8%	89.8%	20.6%	22.5%	21.2%	18.2%	22.0%		
1007																														100%	100%	100%	100%	18.4%	19.5%	18.2%	16.1%	20.0%		
662																															100%	100%	100%	18.4%	19.5%	18.2%	16.1%	20.0%		
796																																100%	100%	100%	18.4%	19.5%	18.2%	16.1%	20.0%	
625																																	100%	100%	100%	18.4%	19.5%	18.2%	16.1%	20.0%
Shintoku																																					77.1%	30.4%	30.9%	29.1%
Toyama																																						30.7%	32.0%	31.2%
Cowden																																						81.8%	68.2%	
RU004																																							67.2%	
RU048																																								

Humano

Bovino

Porcino

Figura 63. Matriz de identidade das sequências deduzidas de aminoácidos a partir das sequências nucleotídicas parciais do gene NSP4 de RVC gerada com o software *BioEdit* (Ibis Therapeutics, EUA). As cepas IAL-RC01, IAL-RC09, IAL-RC12, IAL-RC22, IAL-RC30-36, IAL-RC43 e IAL-RC59 foram detectadas em pacientes apresentando gastroenterite aguda proveniente da vigilância nacional dos RV entre Junho de 2007 e Junho de 2012. As cepas IAL-RC26 e IAL-RC27 foram detectadas em pacientes apresentando gastroenterite aguda proveniente de um surto na cidade de Valentim Gentil, Estado de São Paulo, em 1993. Sequências NSP4 de referência foram obtidas a partir do *GenBank*.

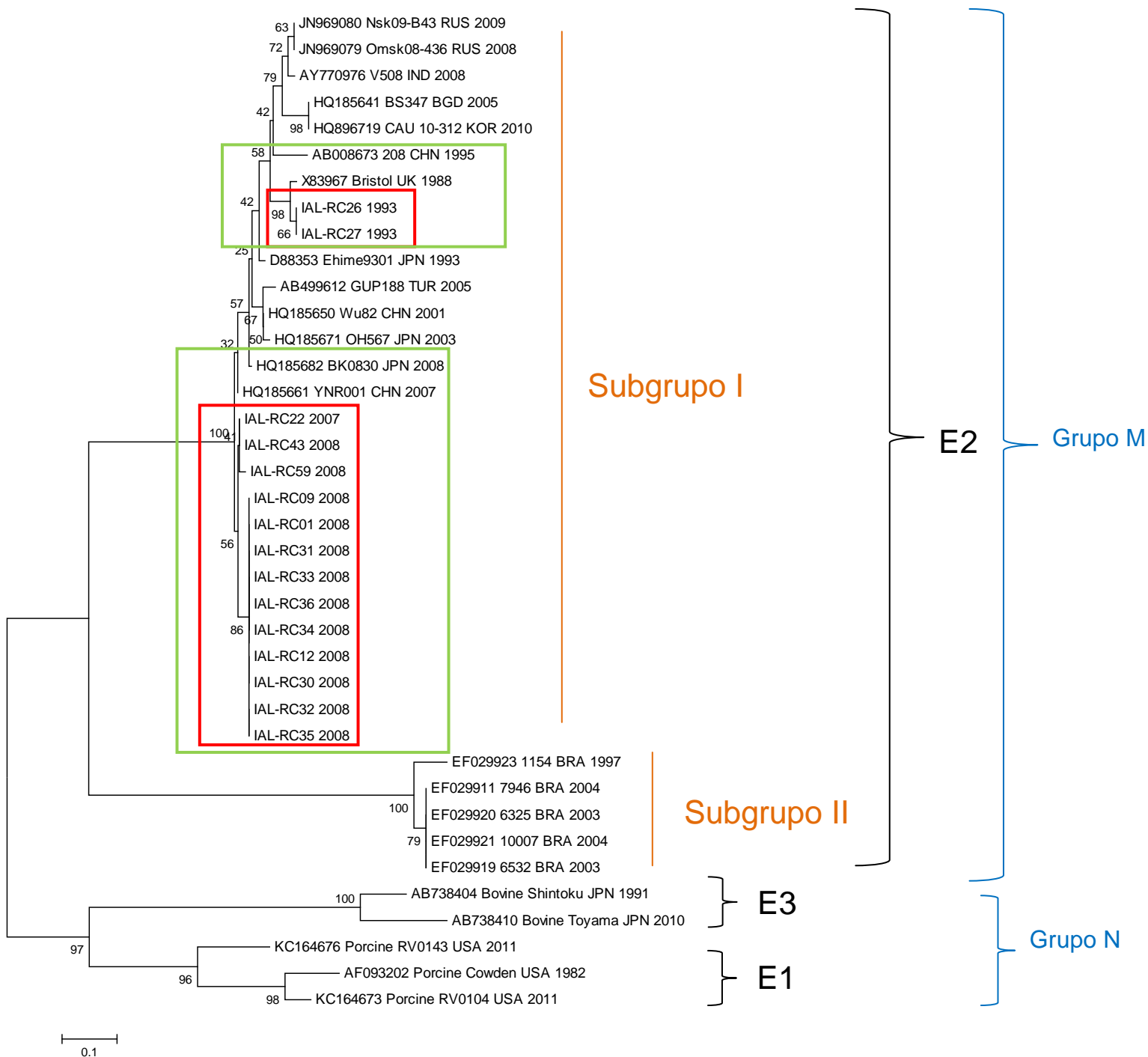


Figura 64. Árvore genealógica do tipo *Neighbor-Joining* (NJ) das sequências de aminoácidos deduzidas a partir das sequências nucleotídicas parciais do gene NSP4 de RVC das cepas IAL-RC gerada com o software MEGA 4.0. As cepas IAL-RC foram detectadas nos anos de 1993 e 2007/2008 em pacientes apresentando sintomas de gastroenterite aguda provenientes da vigilância nacional dos RV (retângulos vermelhos). Os retângulos verdes destacam as cepas de RVC com maior percentual de similaridade em relação às cepas IAL-RC. Sequências RVC NSP4 de referência foram obtidas a partir do *GenBank*. E1 a E3 representam os genótipos identificados. M e N representam dois grupos geneticamente diferentes. I e II representam dois subgrupos geneticamente distintos. As espécies e os números de acesso de cada cepa estão indicados. As siglas dos países de cada cepa estão descritas no Anexo 1. A escala indica a diversidade genética. Percentuais dos valores de *bootstrap* estão localizados nos nós dos ramos.

5. DISCUSSÃO

5. DICUSSÃO

5.1 Rotavírus do grupo A

5.1.1 Vigilância laboratorial dos RVA

A vigilância global dos RVA assumiu um papel importante dentro dos programas de vacinação, sendo de vital importância para descrever a distribuição dos genótipos em diferentes países e regiões após a introdução da vacina, além de identificar a emergência de novas cepas (Desai et al., 2010). O presente estudo documenta a elevada taxa de detecção do genótipo G2P[4] no Brasil após a introdução da vacina, corroborando o relatado em diversos estudos anteriores (Morillo et al., 2010; Sáfadi et al., 2010; Borges et al., 2011; Carvalho-Costa et al., 2011; Linhares et al., 2011). Entretanto, também revela uma tendência de substituição do genótipo G2P[4] por outras cepas de RVA, tais como G9P[8] e G12P[8], em anos mais recentes.

No Brasil, há poucos estudos sobre a vigilância dos RVA na população geral. A maioria dos trabalhos é voltado para crianças ≤ 5 anos de idade (Timenetsky et al., 1994; Linhares et al., 2000; Carmona et al., 2004; Morillo et al., 2010; Sáfadi et al., 2010; Borges et al., 2011; Carvalho-Costa et al., 2011; Linhares et al., 2011). Neste trabalho, a frequência da infecção por RVA (19,1%) foi menor que a porcentagem global (24,3%), assim como aquelas observadas em outros países da América Latina: Argentina (28,3%), Bolívia (28,9%), Chile (31,1%), Colômbia (30%), Costa Rica (44,3%), Equador (30,9%), Guatemala (30,1%), Panamá (24,9%), Paraguai (25,3%), Peru (25,1) e Uruguai (37,5 %) (Linhares et al., 2011). No entanto, foi semelhante à frequência encontrada no México (19,9%) e Nicarágua (19,0%) (Linhares et al., 2011).

Um estudo prévio realizado no estado de São Paulo entre 1996 e 2003 mostrou que a porcentagem de RVA na população geral foi de 25% (Carmona et al., 2006). O presente estudo (2007-2012) demonstrou uma redução dos casos de RVA confirmados por laboratório (19,1%) nos estados de abrangência do NDE, comparável às investigações mais recentes (1990-2009) (20,3%) (Linhares et al., 2011). A diminuição dos casos de gastroenterite causados por

RVA é consistente com o comportamento da doença diarreica após a introdução vacinal, uma vez que a proporção total de crianças ≤ 5 anos (grupo com maiores taxas de infecção por RVA nos anos pré-vacina e com o nível mais alto de cobertura vacinal) foi maior do que os demais grupos etários (6-18 anos, 19-59 anos e ≥ 60 anos).

RVA foi detectado em maior frequência no grupo etário de 6-18 anos (40,6%), enquanto a porcentagem de detecção entre crianças ≤ 5 anos foi de 19,5%. As taxas de infecção por RVA entre as crianças ≤ 5 anos, provavelmente, continuará a diminuir nos próximos anos, uma vez que sucessivas coortes de nascidos serão vacinadas (Desai et al., 2012). Mudanças na epidemiologia da doença causada por RVA são esperadas na era pós-vacinal, tais como a alteração na idade média acometida (Patel et al., 2011). A tendência do RVA em infectar crianças mais velhas após a implementação da vacina tem sido observada nos EUA (Desai et al., 2012) e no Brasil (Dulgheroff et al., 2012). Uma possível explicação para essa tendência é a proteção indireta das crianças não vacinadas conferida pela redução da transmissão de RVA na comunidade (“imunidade de rebanho”), resultando em uma coorte de suscetíveis composta por crianças mais velhas, as quais não foram expostas à infecção natural por RVA nos anos anteriores (Desai et al., 2012). Entretanto, ainda não é possível prever se a transmissão de RVA persistirá nesses grupos etários mais velhos mesmo se a cobertura vacinal em crianças mais novas aumentar. As consequências da vacinação no ambiente familiar e sua transmissão na comunidade provavelmente irão flutuar conforme o acúmulo de crianças suscetíveis à infecção por RVA e sua posterior infecção (Payne et al., 2011).

Por outro lado, registros pós-vacinais também indicam uma redução na doença causada por RVA entre os membros dos grupos etários fora da faixa de idade vacinada (Tate et al., 2009; Buttery et al., 2011), sugerindo que as crianças mais novas atuam como transmissores primários da infecção (Patel et al., 2011). Como citado anteriormente, a proteção indireta é consequência da redução da transmissão do agente infeccioso na comunidade, mas nesse caso, ampliando os benefícios diretos da vacinação para indivíduos vacinados e não vacinados (Anderson e May, 1990). Tal fenômeno não foi previamente observado ou avaliado nos ensaios clínicos de nenhuma das duas vacinas

atualmente licenciadas no mercado (Payne et al., 2011). Os benefícios indiretos e/ou prejuízos causados pela vacinação contra RVA ainda precisam ser melhor explorados.

O presente trabalho também revela um aumento na positividade de RVA em adultos. Houve um aumento na proporção de positividade entre amostras de pacientes adultos (9,4%; 114/1206), quando comparado a estudos anteriores (7,1%; 55/774) (Carmona et al., 2006). Portanto, a elevação da positividade nessa faixa etária é um dado real, e não um artefato decorrente do aumento do número total de amostras. O aumento da infecção por RVA em adultos também foi observado na Austrália (Kirkwood et al., 2011). Mudanças no perfil antigênico de cepas de RVA comumente circulantes podem estar por trás desses aumentos, pois permitem que as mesmas evadam a proteção do sistema imune conferida pela exposição às cepas historicamente mais antigas (Kirkwood et al., 2011).

As infecções causadas por RVA foram detectadas com maior frequência durante os meses de inverno (estação seca), como geralmente é observado no Brasil, principalmente nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste (Pereira et al., 1993; Dulgheroff et al., 2012). Entretanto, um evento particular foi observado. A frequência de detecção de RVA geralmente se concentra entre junho e agosto no país (Carmona et al., 2006; Andreasi et al., 2007; Gouvea et al., 2007; Ribeiro et al., 2008; Gouvea et al., 2009). No entanto, a taxa de positividade de RVA neste estudo atingiu seu pico em setembro, mês que marca o início da estação chuvosa. Padrões sazonais e climáticos de diversas doenças infecciosas são bem conhecidos e descritos (Patz et al., 1996), sendo o aquecimento global uma das principais mudanças ambientais em curso atualmente. Dessa forma, pode-se sugerir que esta variação climática seria capaz de promover uma série de impactos sobre a ecologia da infecção por RVA na população brasileira.

Alternativamente, estudos pós-implantação vacinal conduzidos em diferentes países identificaram um dado muito consistente no que diz respeito a sazonalidade e a propagação das infecções causadas por RVA (Patel et al., 2011). Estudos nos EUA e na Bélgica mostraram um atraso de 1 a 2 meses no início da sazonalidade da infecção por RVA após implantação da vacina (Tate et al., 2011; Braeckman et al., 2011). A dinâmica das epidemias anuais de RVA

poderia ser direcionada pelo acúmulo de indivíduos totalmente suscetíveis (i.e. recém-nascidos) na população. Sugere-se que a vacinação generalizada seja capaz de reduzir o número de indivíduos suscetíveis, retardando, assim, o período de ocorrência do RVA, e também, potencialmente, alterando o padrão de sazonalidade em todo o país (Curns et al., 2011). Esta hipótese foi testada nos EUA por Curns et al., (2011) e fornece evidências de que a dinâmica espaço-temporal da atividade do RVA é, provavelmente, impulsionada pela taxa de acúmulo desses indivíduos suscetíveis e não somente por fatores ambientais.

Uma diminuição significativa na porcentagem de infecção por RVA foi observada em 2009 (2,3%). Essa curiosa ausência de infecções por RVA no país durante esse ano também foi observada em estudos anteriores (Cilli et al., 2011; Dulgheroff et al., 2012). Entretanto, a grande redução nos casos de RVA descrita em 2009 não foi acompanhada por uma diminuição no número de casos de diarreia não causada por RVA, eliminando a possibilidade de viés devido à coleta de amostras (http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/casos_dda_16_04_2012.pdf, <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/vigilanciadda.pdf>). Em 2010, o Brasil evidenciou o ressurgimento dos casos de diarreia associados a RVA, retornando ao número detectado em 2008. A redução substancial da atividade de RVA em uma temporada seguido pelo ressurgimento na temporada seguinte tem sido relatada após a introdução vacinal (Tatte et al., 2011; Dulgheroff et al., 2012). Além disso, de acordo com os registros do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), durante o ano de 2009, o Brasil experimentou um inverno atípicamente chuvoso, com altos índices pluviométricos para a estação decorrentes do fenômeno El Niño (<http://www.inmet.gov.br>). Dessa forma, essa condição climática alterada poderia ter contribuído para a baixa frequência de detecção observada.

Ainda em 2009, a pandemia de influenza A (H1N1) se disseminou de forma surpreendentemente rápida, representando um desafio significativo para os centros de vigilância epidemiológica no Brasil e no mundo. Foi necessário estabelecer um equilíbrio nos sistemas de saúde entre a resposta frente a pandemia de H1N1 emergente e a habilidade de prosseguir com a vigilância contínua de outros vírus, incluindo RVA. Um estudo conduzido por Cox et al.

(2009) avaliou o impacto da pandemia de influenza H1N1 nas notificações de outros agravos. A análise revelou que a notificação de outros eventos caiu a taxas significativamente baixas, sugerindo um impacto importante no processo de notificação de agravos em saúde em situações que exijam intensa mobilização nos recursos de saúde pública (Cox et al., 2009). É importante ressaltar que durante a condução do presente estudo, uma baixa taxa de detecção de RVA também foi observada em 2012 (3,1%). Entretanto, este trabalho foi finalizado em Junho de 2012 e, portanto, antes do início da sazonalidade de RVA.

Os resultados obtidos na genotipagem das amostras do presente estudo estão de acordo com dados recentemente publicados provenientes da vigilância de RVA na população pediátrica brasileira entre 2007 e 2010, incluindo a notável predominância do genótipo G2P[4] (Cilli et al., 2011; Dulgheroff et al., 2012; Ferreira et al., 2012). No entanto, outros genótipos comuns (i.e. G1P[8], G3P[8] ou G9P[8]) continuam a circular marginalmente ao longo do tempo, como também se observa na vigilância de RVA da Austrália (Kirkwood et al., 2010). A emergência de G2P[4] a partir de 2006 tem sido relatada em populações vacinadas na Austrália (RotarixTM e RotateqTM) e Nicarágua (RotateqTM) (Patel et al., 2008; Kirkwood et al., 2009), mas também, em menor escala, em populações não-vacinadas de Portugal, Argentina e Paraguai (Amarilla et al., 2007; Antunes et al., 2009; Esteban et al., 2010). Essa emergência do genótipo G2P[4], provavelmente, segue uma tendência mundial ditada pelas flutuações oscilatórias dos genótipos de RVA e, aparentemente, não está relacionada à vacinação (Dulgheroff et al., 2012).

Cepas exibindo genótipo G8 foram identificadas em 2009, 2010 e 2011; corroborando a identificação contínua e esporádica dessas cepas como causa de gastroenterite aguda na população brasileira (Santos et al., 1998b; Volotão et al., 2006; Montenegro et al., 2007). Genótipos P[3] e P[9] também foram identificados durante o período de estudo. No Brasil, investigações anteriores relataram a detecção de P[3] associado a G3 (Timenetsky et al., 1994; Santos et al., 1994a) e de P[9] associado a G10 (Volotão et al., 2006). Estes relatos continuam a evidenciar o baixo índice de detecção dessas cepas nos habitantes brasileiros.

O presente estudo mostra que G9P[8] re-emergiu como genótipo

dominante em 2011, representando 39,8% do total de cepas identificadas. G2P[4] foi o segundo genótipo predominante nesse ano, compreendendo 17,5%. Esta investigação destaca as flutuações genotípicas em curso e revela o retorno de G9 como genótipo dominante no Brasil, semelhante ao observado no início dos anos 2000 durante a era pré-vacinal (Carmona et al., 2006; Munford et al., 2009; Siqueira et al., 2010). Na Austrália, o emprego concomitante de ambas as vacinas (RotateqTM e RotarixTM) proporciona uma oportunidade única para se comparar o efeito que cada uma exerce sobre a circulação dos genótipos selvagens (Kirkwood et al., 2010). Assim, na Austrália, as cepas G2 e G9 são mais prevalentes nos estados que empregam RotarixTM, enquanto cepas G3 são mais prevalentes nos estados que vacinam com RotateqTM (Kirkwood et al., 2008). Dessa forma, a frequência relativamente mais alta na detecção dos genótipos G9 e G2 associados aos casos de RVA observada no Brasil em 2011, poderia refletir um cenário similar ao observado na Austrália após a introdução da RotarixTM. As diferenças notadas na frequência das cepas detectadas não implicam, necessariamente, na falta de proteção gerada por qualquer uma das vacinas contra um genótipo em particular, mas sim, destaca a variação que pode ocorrer devido à flutuação natural e anual da prevalência das cepas de RVA (Kirkwood et al., 2008).

No estudo atual, G12 foi detectado em 4,9% do total de casos, sendo 20% em 2011 e 61,6% em 2012. Antes de 1998, G12 era considerado um genótipo raramente associado à infecção por RVA em humanos (Page et al., 2009). No entanto, G12, em associação com P[8] e P[6] está emergindo em todo o mundo (O'Ryan, 2009; Page et al., 2009) e a elevada presença de G12 detectada nos últimos dois anos do presente estudo, sugere que este genótipo também está emergindo e circulando na população brasileira. A presença de G12 associado a P[9] vem sendo relatado na América do Sul nos últimos anos, principalmente na Argentina, Brasil e Paraguai (Assunção) (Pietruchinski et al., 2006; Castello et al., 2009a; Martínez et al., 2010). A região sul do Brasil faz fronteira com Paraguai e Argentina, um fato que poderia indicar a propagação desta cepa dentro do cone sul da América (Martínez et al., 2010). Na verdade, o rápido aparecimento e propagação global da cepa G12 em menos de uma década ilustra o potencial de evolução dos RVA (Kirkwood et al., 2010;

Matthijenssens et al., 2010). Estudos futuros devem ser realizados a fim de verificar a real emergência das cepas G12 no país.

Infecções mistas são observadas em muitas populações, inclusive no Brasil (Timenetsky et al., 1994; Timenetsky et al., 1997; Arguelles et al., 2000; Nielsen et al., 2005; Carmona et al., 2006) e pode ser explicada pelo rearranjo natural entre cepas comuns (Nielsen et al., 2005). Curiosamente, em 2010 foi observada alta variedade de infecções mistas atípicas. Infecções mistas são encontradas quando genótipos diversos circulam ao mesmo tempo. Este fenômeno é mais comum em países que apresentam uma grande variação de combinações genotípicas detectadas regularmente (Ribas Mde et al., 2011), como o Brasil. Entretanto, muitas dessas combinações genotípicas acarretam em evoluções “sem saída”, pois apenas poucas cepas virais apresentam a aptidão necessária para a transmissão de forma eficiente dentro da população e emergir como um patógeno humano significativo (Iturriza-Gómara et al., 2011). Considerando a coleção descrita no presente estudo, esse seria o caso das cepas G3P[4], as quais emergiram em quantidade significativa em 2010. Por outro lado, o número amostral foi bastante desigual ao longo dos anos avaliados. Mais de 50% das amostras positivas para RVA foram detectadas em 2010. Os anos de 2008 e 2011 contribuíram com apenas 1/3 das amostras positivas para RVA, e muito menos é observado para os outros anos. Dessa forma, a grande diversidade de combinações G/P observada em 2010 pode ser decorrência, simplismente, do número amostral coletado naquele ano.

Vale ressaltar que o uso da vacina pode intensificar a mistura de cepas, pois a pressão vacinal tende a selecionar as cepas que melhor se replicam em um ambiente com alta pressão imunológica (Kirkwood et al., 2010). Ainda, o uso da PCR multiplex na identificação de infecções mistas deve ser tratado com precaução. A possibilidade de ligação não específica dos primers, diferentes concentrações de cepas de RVA e o risco de contaminação (principalmente quando se manipula uma grande quantidade de amostras fecais) devem ser levados em consideração (Nielsen et al., 2005).

Combinações genotípicas pouco frequentes (i.e. G1P[4], G2P[6] ou G9P[4]) foram detectadas em menor taxa no presente estudo (2007-2012) quando comparadas aos períodos pré-vacinação (Timenetsky et al., 1994; Leite et al., 1996; Carmona et al., 2006). Esses dados sugerem uma redução da

diversidade genotípica local, ao contrário dos últimos resultados divulgados pela vigilância de RVA australiana (Kirkwood et al., 2011). Esses genótipos menos comuns encontrados podem representar rearranjos *in vivo*, originados a partir de infecções mistas (Iturriza-Gómara et al., 2001; Muhsen et al., 2009). Entretanto, a análise de regressão linear mostra que o número de infecções mistas encontrado em nosso estudo não está correlacionado com o número de genótipos não usuais detectado ($R=0.638$; $N=7$). Essa análise superficial, sugere que a frequência de infecções mistas não determina o aparecimento de rearranjos naturais no Brasil, diferentemente do que foi observado em Israel (Muhsen et al., 2009). Genótipos pouco frequentes de RVA continuam a despertar interesse mundial devido ao possível impacto que podem ter sobre os programas de vacinação (Kirkwood et al., 2008).

G4P[8] é uma das combinações genotípicas mais comumente encontrada em seres humanos em todo o mundo (Timenetsky et al., 1994; Parashar et al., 2006). No entanto, não foi detectada neste estudo. Globalmente, a prevalência de G4 diminuiu ligeiramente durante 1996-2007 (Bányai et al., 2012). A mudança sazonal das cepas de RVA é um mecanismo possivelmente utilizado pelo vírus para escapar de imunidade de rebanho adquirida por infecções anteriores e, portanto, em última análise, persistir na população humana (Parra, 2009). A mudança no padrão de circulação dos genótipos de RVA associada a uma redução significativa da diversidade de cepas pode ter implicações importantes na evolução dos RVA (Dulgheroff et al., 2012). Vale ressaltar que no presente estudo algumas amostras positivas para RVA não puderam ser genotipadas por RT-PCR. Infelizmente, cepas não genotipadas têm sido relatadas em praticamente todos os estudos epidemiológicos ao redor do mundo, independentemente do método utilizado (Honma et al., 2007).

O presente estudo, baseado em vigilância laboratorial, provavelmente não ocupa uma posição de representatividade nacional. Porém os resultados de genotipagem obtidos nessa pesquisa, juntamente com aqueles coletados em anos anteriores, destacam a natureza imprevisível das mudanças na prevalência das cepas de RVA em todo o Brasil. Além disso, a identificação de genótipos VP7 e VP4 raros ou pouco frequentes ilustra ainda mais a diversidade das cepas capazes de causar doença diarreica grave na

população. Dados populacionais consistentes poderiam ajudar a melhorar a nossa compreensão sobre a dinâmica de transmissão dos RVA e vislumbrar todo o potencial vacinal (Patel et al., 2011). Mudanças rápidas no padrão genotípico destacam a existência de uma população dinâmica de cepas selvagens de RVA. Além disso, a pressão vacinal poderá acelerar processo seletivo de cepas (Kirkwood et al., 2011).

Nos países com sazonalidade marcada e programa de vacinação, como o Brasil, a vigilância epidemiológica e laboratorial dos RVA deve ser estendida para os outros meses do ano, onde não se espera as maiores taxas de detecção, a fim de compreender completamente a importância dessas mudanças para a saúde pública e para a sazonalidade das epidemias (Patel et al., 2011). Compreender as flutuações dos genótipos de RVA utilizando uma vigilância nacional multicêntrica irá fornecer informações valiosas sobre a eficácia da vacina nos próximos anos. No Brasil, encontra-se um cenário de rica diversidade genômica, alta prevalência de cepas incomuns e infecções mistas, aumentando em muito as chances de evolução de novas cepas de RVA.

5.1.2 Genótipo G8P[6]

O presente estudo detectou cepas humanas de RVA com a combinação não usual G8P[6] em crianças indígenas com gastroenterite aguda. O genótipo humano G8 é detectado globalmente, incluindo Europa (Cooney et al., 2001), América do Sul (Santos et al., 1998b; Montenegro et al., 2007; Gómez et al., 2010), Austrália (Bishop et al., 2001) e Ásia (Kang et al., 2002). Entretanto, na África este genótipo parece ter importância epidemiológica especial, sendo detectado em frequência tão elevada quanto as cepas G3 e G4, mundialmente mais comuns (Santos e Hoshino, 2005; Gentsch et al., 2005; Page et al., 2010).

A presente investigação demonstrou que a cepa humana brasileira G8 IAL-RN376 compartilha alta homologia na sequência de RNA com cepas humanas detectadas na República Democrática do Congo (Matthijssens et al., 2006). A íntima relação genética entre cepas humanas G8 brasileiras e africanas já foi descrita anteriormente (Montenegro et al., 2007; Gómez et al., 2010; Page et al., 2010). As populações do Brasil e da África sempre estiveram

historicamente interconectadas, destacando-se o significativo fluxo migratório ocorrido no século 19 durante o período de tráfico negreiro (Gómez et al., 2010). Pode-se especular que essa situação particular tenha favorecido a troca de cepas de RVA. Entretanto, atualmente, a questão sobre como essas cepas são transportadas de um continente para outro (i.e. viagens aéreas internacionais, produtos vegetais e animais importados e/ou exportados) (Page et al., 2010), permanece desconhecida.

O genótipo G8 também é comumente detectado em animais e já foi descrito em porcos, cavalos e gado (Cooney et al., 2001). Por essa razão, a origem das cepas G8 nos humanos vem sendo investigada nos últimos anos e foi sugerida a transmissão interespecie a partir de bovinos (Adah et al., 2003; Matthijssens et al., 2006; Esona et al., 2009; Ghosh et al., 2011). A análise comparativa das sequências de nucleotídeos mostrou que a cepa humana brasileira IAL-RN376 esta geneticamente relacionada à cepa G8 bovina NGRBg8 detectada na África. De fato, as cepas humanas G8 africanas, DRC88 e DRC86, também exibem uma alta identidade nucleotídica com essa mesma cepa bovina NGRBg8 (Matthijssens et al., 2006). Os dados disponíveis na literatura sobre cepas bovinas de RVA circulantes no Brasil mostram que o genótipo G8 é detectado no rebanho bovino da região Centro-Oeste do país (Alfieri et al., 2004). Populações indígenas e animais frequentemente compartilham uma fonte de água comum, aumentando a probabilidade de ocorrer uma transmissão de cepas de RVA de animais para os seres humanos. Portanto, não seria nenhuma surpresa se uma cepa G8, sabidamente circulante em gado, fosse detectada em uma criança indígena habitante da mesma região. Infelizmente, amostras fecais provenientes dos animais da região não foram coletadas e a investigação sobre a presença de RVA não pode ser realizada.

Além disso, a cepa humana G8 IAL-RN376 também mostrou uma relação gênica próxima com a cepa G8 símia KY1646. Entretanto, a cepa símia KY1646 não possui origem animal. Essa cepa foi isolada a partir de amostras de macaco-vervet (V1888) experimentalmente infectado por uma cepa de RVA obtida das fezes de uma criança de 6 anos de idade (JMM-9/11) hospitalizada com gastroenterite aguda no Hospital MP Shan em Nairobi, Kênia, em 1999 (Chege et al., 2005). Cepas G8 com características genéticas animais

raramente persistem na população humana por longos períodos (Page et al., 2010).

O sítio de glicosilação N da proteína VP7 está localizado no aminoácido 69 na cepa IAL-RN376 e o mesmo tende a estar conservado em todas as cepas de RVA (Martella et al., 2003). Em adição, a cepa humana IAL-RN376 possui um segundo sítio potencial de glicosilação localizado no aminoácido 238, o qual está presente na maioria das cepas G8, tanto bovinas quanto humanas (Gouvea et al., 1990; Okada et al., 2002). A glicosilação no resíduo 238 pode acarretar em alterações na imunogenicidade das cepas. Estudos anteriores demonstraram que essa glicosilação reduz a neutralização de cepas animais de RVA por soros hiperimunes e anticorpos monoclonais (Ciarlet et al., 1997). Ocorreu uma substituição de aminoácido dentro do principal sítio antigênico da proteína VP7, a região D (aminoácidos 143 a 152), na posição 146^{T→V}. Na região antigênica E (aminoácidos 207 a 220), a qual se encontra espacialmente próxima a região D (da Silva et al., 2011), houve uma substituição de aminoácido na posição 218^{A→T}. Unindo essas informações, tais substituições poderiam promover uma alteração na antigenicidade de cada região e, talvez, modificar a interação do vírus com o sistema imune do hospedeiro. O real impacto das substituições de aminoácidos não pode ser previsto baseando-se apenas nas informações referentes a sequência proteica (Zeller et al., 2012). Estudos que visam correlacionar diferenças nucleotídicas intragenotípicas com características antigênicas são extremamente importantes (Jin et al., 1996; Hoshino et al., 2004).

Cepas de RVA humanas G8 estão associadas à uma grande variedade de genótipos VP4, incluindo P[1], P[2], P[4], P[5], P[6], P[8], P[10], P[11] e P[14] (Qian et al., 1991; Gerna et al., 1994; Cunliffe et al., 1999; Fukai et al., 1999; Fischer et al., 2000; Jagannath et al., 2000; Adah et al., 2001; Kang et al., 2002; Okada et al., 2002; Matthijnssens et al., 2006). A capacidade de rearranjo com distintas cepas VP4 é observada frequentemente com o genótipo G9 (Laird et al., 2003). Cepas G8 também exibem essa habilidade e, repetidamente, formam rearranjos com cepas de RVA ecologicamente mais adaptadas ao intestino humano, tais como P[6], P[8] e P[4] (Page et al., 2010). Entretanto, o fato dos genótipos G8P[8], G8P[6] e G8P[4] não permanecerem em circulação, indica que essas combinações binárias ainda não atingiram a

aptidão necessária para se tornarem um patógeno humano bem sucedido, com exceção do continente Africano (Esona et al., 2009; Gómez et al., 2010).

O genótipo P[6] está geralmente associado com cepas não usuais ou novos genótipos emergentes em populações *naïve* (Aminu et al., 2010). Portanto, rearranjos com cepas P[6] talvez criem mecanismos que permitam o estabelecimento de genótipos G, anteriormente raros, em uma população *naïve* (Page et al., 2010). A análise do gene VP4 e o crescente aumento no número de sequências disponíveis no *GenBank* permitiu a identificação de uma relação gênica próxima entre as cepas P[6] humanas IAL-RN376 e IAL-RN377 detectadas nesse estudo e a cepa P[6] de morcego KE4852/07 isolada na África. A cepa de morcego KE4852/07 também está intimamente relacionada às cepas HST435 e HST369, isoladas a partir de fezes de recém-nascidos na cidade de Belém do Pará, região Norte do Brasil (Mascarenhas et al., 2007). A descoberta de que a cepa de morcego KE4852/07 é praticamente idêntica ao P[6] humano foi previamente relatado por Esona et al (2010a). Atualmente, os morcegos são considerados os principais reservatórios de vírus, os quais são capazes de atravessar a barreira das espécies e infectar humanos, além de mamíferos domésticos e selvagens (Calisher et al., 2006). Existem inúmeras oportunidades de contato entre morcegos e humanos e, conseqüentemente, suas respectivas cepas de RVA (Esona et al., 2010a). Ainda, nas tribos indígenas, o contato entre humanos e morcegos é, provavelmente, mais frequente.

A clivagem da espícula VP4 pela tripsina em dois polipetídeos, VP8* e VP5*, é necessária para a ativação da infectividade do RVA (Gorziglia et al., 1988). Os sítios potenciais de clivagem da VP4 localizados nas argininas das posições 230, 240 e 246 estão mantidos nas cepas humanas P[6] IAL-RN376 e IAL-RN377, garantindo sua infectividade. Os quatro resíduos de prolina (68, 71, 224 e 225) também estão conservados nas cepas IAL-RN376 e IAL-RN377. Essas prolinas conservadas são responsáveis pela conformação da proteína VP4, uma vez que mantêm sua estrutura tridimensional (Gorziglia et al., 1988).

Linhagens de cepas G8 e P[6] já foram descritas anteriormente (Fukai et al., 2004; Martella et al., 2006; Pietsch et al., 2009). A análise filogenética realizada nesse estudo permite especular uma provável origem animal para

ambos os genótipos, uma vez que as cepas animais estão localizadas na base dos dendogramas. Apoiando-se no dendograma filogenético e nas substituições de aminoácidos, o presente trabalho sugeriu a subclassificação das cepas G8 em 6 linhagens diferentes. Esses dados estão de acordo com a classificação previamente proposta por Fukai et al. (2004) (linhagens G8a, G8b, G8c e G8d). Por outro lado, a subclassificação proposta por Pietsch et al. (2009) não incluiu nenhuma das linhagens G8 observadas no atual estudo. Na presente investigação, três cepas humanas G8 agruparam dentro da linhagem III (G8c), juntamente com a cepa bovina 678, 4 cepas humanas G8 formaram a linhagem V (G8d), juntamente com a cepa bovina A5 e 14 cepas humanas G8 agruparam dentro da linhagem VI (não descrita por Fukai et al.(2004)), juntamente com a cepa bovina NGRBg8. Esses resultados juntos sugerem uma origem evolucionária comum para os G8 humanos e bovinos e, talvez, represente eventos recentes de transmissão interespecie entre humanos e gado, os quais ocorreram de forma independente ao evento que conduziu a formação da linhagem I (G8b). É necessário realizar uma análise genômica mais profunda das sequências das cepas G8 a fim de se estabelecer as linhagens de forma correta.

Martella et al. (2006) e Mascarenhas et al. (2007) durante análise de cepas de RVA P[6] humanas e porcinas encontraram similaridades entre elas. Entretanto, no presente estudo, as cepas humanas P[6] IAL-RN376 e IAL-RN377 não agruparam com cepas de origem suína, mas sim, exibiram maior similaridade com outras cepas humanas (linhagem I). Na verdade, as cepas humanas P[6], incluindo IAL-RN376 e IAL-RN377, dividem um grupo genético com a cepa de quiróptero KE4852/07, sugerindo que tais cepas compartilham uma origem evolucionária em comum (Esona et al., 2010a). Análises adicionais da sequência de nucleotídeos de cepas P[6] humanas e animais podem ajudar a esclarecer a verdadeira origem zoonótica desse genótipo em humanos.

Esse estudo também propôs a construção de árvores genealógicas baseadas em aminoácidos como uma forma de auxiliar o estudo das relações genéticas entre as cepas de RVA G8 e P[6]. De fato, essa estratégia permitiu observar uma diferença particular entre a árvore baseada em nucleotídeos e a árvore baseada em aminoácidos. A árvore baseada em aminoácidos das cepas de RVA G8 não evidenciou as linhagens descritas na árvore filogenética,

entretanto, é possível observar que as relações genéticas entre as cepas estão mantidas. Todavia, o valor evolucionário desse achado permanece obscuro.

Com base na presente investigação, pode-se propor a hipótese de que um suposto rearranjo entre cepas de RVA G8 de origem bovina e P[6] de quirópteros poderia ter ocorrido em um hospedeiro(s) animal anteriormente à sua transmissão para humanos. Entretanto, dados recentes sugerem que a cepa P[6] possui origem suína (Martella et al., 2006). Dessa forma, parece fazer sentido sugerir também que os humanos possam servir de reservatório e transmitir cepas P[6] para morcegos, resultando em uma transmissão antropozoonótica de genes de RVA (Esona et al., 2010a). É importante ressaltar que as cepas incomuns de RVA G8P[6] analisadas neste estudo foram detectadas em crianças indígenas. Extrapolando, pode-se sugerir que transmissões antropozoonóticas (animal para humano e vice-versa), provavelmente, ocorram em maior frequência em populações indígenas, uma vez que seus habitantes vivem em condições de higiene precária, em contato próximo com animais e, geralmente, dividem uma fonte de água comum. Além disso, crianças podem estar mais expostas a infecções por RVA do que indivíduos adultos devido ao seu contato íntimo com animais de estimação juntamente com hábitos limitados de higiene característicos da idade.

A caracterização de outros genes do RVA é fundamental para se determinar o perfil genético da cepa G8P[6]. De fato, o sequenciamento dos 11 genes do RVA é recomendado pelo Grupo de Trabalho para Classificação de Rotavírus (*Rotavirus Classification Working Group*) (Matthijnssens et al., 2008b) e permitirá a análise completa dos dados obtidos (Esona et al., 2011). Em adição, existem limitações importantes no estudo das relações genômicas entre cepas RVA de origem animal e os potenciais casos de transmissão zoonótica: as informações epidemiológicas sobre o contato entre humanos e animais não estão disponíveis, assim como a ausência de amostras de fezes dos animais que ocupam a mesma área que os pacientes (Bányai et al., 2010). O presente estudo não é uma exceção a essa regra. Por essa razão, prever a ocorrência de um evento de transmissão zoonótica de uma cepa de RVA em particular frequentemente se apoia apenas em evidências filogenéticas (Bányai et al., 2010).

Em 2006, a vacina monovalente atenuada G1P[8] contra RVA

(Rotarix™) foi incluída no Programa Nacional de Imunização (PNI), prevenindo gastroenterite grave por RVA e induzindo significativa redução na frequência de detecção de RVA em crianças com gastroenterite (Gurgel et al., 2008). Uma vez que, tanto a proteína VP7 quanto a proteína VP4, exercem um papel importante na indução da resposta imune (Kapikian et al., 2001), o conhecimento sobre a distribuição dos genótipos G e P, incluindo a detecção de genótipos emergentes, é crucial para os programas de vacinação contra RVA (Montenegro et al., 2007). Cepas humanas G8 foram detectadas no Brasil antes da introdução da vacina (Santos et al., 1998b; Volotão et al., 2006; Montenegro et al., 2007). Dessa forma, é importante dar continuidade aos estudos de vigilância genotípica no país, visando esclarecer se a cepa G8 constitui um genótipo emergente, como observado em alguns países africanos, e se deve ser levada em consideração na composição de vacinas futuras. Em um estudo recente conduzido por Steele et al. (2012), a vacina Rotarix™ demonstrou ter eficácia contra gastroenterite aguda causada por cepas de RVA que não compartilham os genótipos G e P vacinais (genótipos duplamente heterotípicos), incluindo o genótipo G8 (64,4%).

Concluindo, os resultados obtidos no presente estudo reforçam a teoria de que existem robustas interações entre os RVA de origem animal e humana. Estudos zoonóticos são limitados pela escassa disponibilidade de sequências genômicas de RVA de origem animal (Jere et al., 2012), principalmente do Brasil. A vigilância simultânea das infecções por RVA em animais (incluindo animais selvagens) e humanos (Martella et al., 2006) e o acúmulo de sequências nucleotídicas provenientes de cepas animais (Jere et al., 2012) é vital para a compreensão da ecologia, epidemiologia e evolução desses vírus.

5.1.3 Genótipo G3P[3]

Cães são reconhecidos como vetores nas infecções zoonóticas causadas por vírus, bactérias e parasitas em pessoas de todas as idades. Entretanto, os riscos de transmissão dos vírus entéricos entre cães e humanos são praticamente ignorados (De Grazia et al., 2007). A transmissão interespecie de animais para humanos é a maior fonte de diversidade das cepas de RVA. Todavia, as sequências de nucleotídeos de RVA de origem humana e animal

apresentam diferenças significativas, indicando que a transmissão zoonótica dos RVA talvez seja um evento raro (Wu et al., 2012).

RVA com especificidade G3P[3] são comuns em cães e gatos (Birch et al., 1985; Martella et al., 2001). Entretanto, também existem alguns relatos que descrevem a detecção de cepas G3P[3] em humanos em Israel (Aboudy et al., 1988), EUA (Li et al., 1993; Grant et al., 2011), Tailândia (Khamrin et al., 2006), Itália (De Grazia et al., 2007), Índia (Banerjee et al., 2007), Taiwan (Wu et al., 2012) e Brasil (Timenetsky et al., 1994). Por essa razão, presume-se que a detecção de G3P[3] em humanos deva-se à transmissão zoonótica de RVA a partir de animais para os humanos (Nakagomi e Nakagomi, 2000). Ainda, a detecção de cepas G3P[3] em diferentes regiões geográficas do globo, fornece evidências de que essas cepas não estão vinculadas a uma região em particular.

A análise do genoma das cepas G3P[3] permitiu conhecer a diversidade genética e a evolução dos RVA (De Grazia et al., 2007; Tsugawa e Hoshino, 2008; Grant et al., 2011; Matthijnssens et al., 2011; Wu et al., 2012). Análises nucleotídicas prévias de cepas G3P[3] demonstraram a existência de um genogrupo em particular canino-felino, o qual é formado por cepas de origem animal (i.e. Cat97, CU-1, K9 ou A79-10) e por cepas humanas derivadas de cães e gatos (i.e. HCR3A ou Ro1845) (Martella et al., 2001; Tsugawa e Hoshino, 2008; Matthijnssens et al., 2011). O genoma das cepas que formam o genogrupo canino-felino é diferente do genogrupo composto pelos genomas G3P[3] de origem humana, símia, bovina e porcina (Tsugawa e Hoshino, 2008).

Como citado anteriormente, cepas G3P[3] humanas analisadas por hibridização RNA-RNA e/ou sequenciamento mostraram-se geneticamente relacionadas às cepas de RVA de origem canina e felina (Santos et al., 1994b; Nakagomi et al., 1990; Nakagomi e Nakagomi, 2002; De Grazia et al., 2007; Tsugawa et al., 2008; Grant et al., 2011; Wu et al., 2012). As únicas exceções são as cepas humanas CMH222 (detectada na Tailândia) e CRI33594 (detectada na Índia), as quais parecem estar geneticamente relacionadas com cepas G3P[3] símia e caprina, respectivamente (Khamrin et al., 2006; Banerjee et al., 2007). A análise genética da cepa humana IAL-R2638 revelou que os genes VP7 e VP4 possuem uma possível origem canina. Entretanto, é importante ressaltar que a cepa IAL-R2638 também pode ter sido originada a

partir de um rearranjo entre cepas animais e humanas, originando um híbrido cão-humano. Dessa forma, a caracterização genética de outros genes da cepa humana G3P[3] IAL-R2638 é fundamental para determinar seu perfil genômico completo e, conseqüentemente, sua origem.

O genótipo G3 é a única cepa que infecta praticamente toda a gama de hospedeiros dos RVA: humanos, macacos, coelhos, porcos, aves, gatos, cães, cavalos, camundongos, bois e cordeiros (Khamrin et al., 2006). A cepa humana G3 IAL-R2638, identificada no presente estudo, exibiu uma relação gênica próxima com cepas G3 detectadas no continente americano, tanto de origem canina quanto de origem humana, sugerindo que a proximidade geográfica possa facilitar tal associação.

As regiões hipervariáveis A-F da proteína VP7 se mostraram completamente idênticas entre a cepa humana G3 IAL-R2638 e as cepas A79-10 (canina), CU-1 (canina), RV198-95 (canina), HCR3A (humana), Ro1845 (humana) e Cat97 (felina); exibindo uma porcentagem de identidade de aminoácidos variando de 98,8% a 99,2%. Portanto, pode-se concluir que a divergência de aminoácidos encontra-se fora das regiões hipervariáveis. Todavia, o valor evolucionário desse dado permanece obscuro. De modo interessante, a cepa humana IAL-R2638 exibiu maior identidade de aminoácido na proteína VP7 (99,2%) com a cepa humana derivada de cão HCR3A (EUA), enquanto a maior identidade nucleotídica foi observada em relação às cepas caninas A79-10 (96,3%) (EUA) e CU-1 (95,8%) (EUA). Assumindo os riscos, poderia-se sugerir que o RVA de origem canina talvez adquira mutações durante a sua replicação em um hospedeiro heterólogo (i.e. humano). A localização geográfica também pode ter alguma influência sobre a similaridade proteica observada, uma vez que ambas as cepas foram detectadas no continente americano.

Em adição, a cepa humana G3 IAL-R2638 compartilha substituições de aminoácidos nas posições 147^{A→T}, 212^{A/T→V}, 213^{A/T/N→V} e 242^{A/N/S→V} com as cepas do genogrupo canino-felino, incluindo as cepas humanas derivadas de cães e gatos (i.e. HCR3A e Ro1845). A substituição 147^{A→T} ocorreu dentro do principal sítio antigênico dos RVA, a região D (aminoácidos 143-152). As substituições 212^{A/T→V} e 213^{A/T/N→V} ocorreram dentro da região E (aminoácidos 207-220), a qual é espacialmente próxima à região D (da Silva et al., 2011).

Alguns autores descrevem o sítio antigênico E entre os aminoácidos 208 e 223/224 (Dyall-Smith et al., 1986; Ciarlet et al., 1997b). Portanto, a substituição 221^{A→T}, descrita como ocorrida fora das regiões hipervariáveis no item resultados, poderia ser considerada como uma substituição dentro sítio antigênico E. Unindo essas informações, tais substituições poderiam promover uma alteração na antigenicidade de cada região e, talvez, modificar a interação do vírus com o sistema imune do hospedeiro. O real impacto das substituições de aminoácidos não pode ser previsto baseando-se apenas nas informações referentes a sequência proteica (Zeller et al., 2012). Estudos que visam correlacionar diferenças nucleotídicas intragenotípicas com características antigênicas são extremamente importantes (Jin et al., 1996; Hoshino et al., 2004).

O sítio de glicosilação N da proteína VP7 está localizado no aminoácido 69 na cepa IAL-R2638 e o mesmo tende a estar conservado em todas as cepas de RVA (Martella et al., 2003). Recentemente, foi descrito um sítio extra de glicosilação N localizado no aminoácido 238 em cepas humanas G3 circulantes na Bélgica (Zeller et al., 2012). A glicosilação no resíduo 238 pode acarretar em alterações na imunogenicidade das cepas. Estudos anteriores demonstraram que essa glicosilação reduz a neutralização de cepas animais de RVA por soros hiperimunes e anticorpos monoclonais (Ciarlet et al., 1997). A cepa G3 usada na composição da vacina RotaTeqTM não possui esse sítio adicional de glicosilação 238 (Zeller et al., 2012), assim como as cepas G3P[3] do genogrupo canino-felino. Portanto, teoricamente, essa vacina seria capaz de proteger contra infecções causadas pelo genótipo G3P[3], considerando sua origem genômica altamente conservada.

O genótipo P[3] é frequentemente isolado em amostras animais (i.e. cabra, macaco, gato, cão ou búfalo) (Khamrin et al., 2006). Análises filogenéticas prévias do gene VP4 revelaram duas grandes linhagens dentro do genótipo P[3] (Santos et al., 1998a; Khamrin et al., 2006; Matthijssens et al., 2010b), corroborando os dados obtidos na presente investigação.

A clivagem da espícula VP4 pela tripsina em dois polipetídeos, VP8* e VP5*, é necessária para a ativação da infectividade do RVA (Gorziglia et al., 1988). Os sítios potenciais de clivagem da VP4 localizados nas argininas/lisinas das posições 231, 241 e 247 estão mantidos na cepa humana

P[3] IAL-R2638, garantindo sua infectividade. Os quatro resíduos de prolina (68, 71, 225 e 226) também estão conservados na cepa IAL-R2638. Essas prolinas conservadas são responsáveis pela conformação da proteína VP4, uma vez que mantêm sua estrutura tridimensional (Gorziglia et al., 1988).

A diversidade genética nas sequências nucleotídicas do gene VP4 dos RVA é conhecida. Cepas VP4 animais, incluindo as cepas P[3] caninas e felinas, possuem aminoácidos diferentes nas posições correspondentes das cepas VP4 humanas (Taniguchi et al., 1994). Nas cepas VP4 humanas o resíduo de cisteína está localizado na posição 215, os resíduos de prolina estão localizados nas posições 224 e 225, e os resíduos de arginina estão localizados nas posições 230, 240 e 246. Entretanto, nas cepas VP4 animais, o resíduo de cisteína está localizado na posição 216, os resíduos de prolina nas posições 225 e 226, e os resíduos de arginina nas posições 231, 241 e 247 (Gorziglia et al., 1988; Taniguchi et al., 1994). Essas diferenças nas posições dos aminoácidos foram reconhecidas na cepa humana P[3] IAL-R2638. A comparação das sequências de nucleotídeos do fragmento VP8* de 7 cepas representativas (Wa e WI61 para o genótipo P[8], DS-1 para o genótipo P[4], Gottfried e M37 para o genótipo P[6], K9 e HCR3A para o genótipo P[3]) indicou a inserção de 3 nucleotídeos nas cepas P[3]: 2 timinas, uma na posição 399 e outra na posição 400, e uma citosina na posição 409. Provavelmente, a inserção desses 3 nucleotídeos resultou na adição de um aminoácido após a posição 132.

Cepas VP4 que compartilham identidade proteica >89% (Gorziglia et al., 1990) e identidade nucleotídica >80% (*cut-off*) (Matthijssens et al., 2008b) são consideradas como pertencentes ao mesmo genótipo P. Os dados obtidos no presente trabalho indicam que a proteína VP4 de 4 cepas P[3] (símia RRV, humana CMH222, caprina GVR e búfalo 10733) exibem uma identidade proteica de apenas 84,2-85% (identidade nucleotídica 77,5-77,7%) em relação ao genogrupo canino-felino, o qual engloba as cepas P[3] de referência. Análises filogenéticas anteriores com cepas G3P[3] já haviam descrito 2 grandes linhagens para o genótipo P[3], sendo uma dessas linhagens composta, justamente, por essas 4 cepas (Santos et al., 1998a; Khamrin et al., 2006; Matthijssens et al., 2010b). Nesse contexto, seria interessante avaliar se essas cepas realmente pertencem ao genótipo P[3].

A principal hipótese na base dos métodos de análise filogenética é de que todas as alterações nucleotídicas acarretam em evolução de forma independente umas das outras (Sherbakov e Triboy, 2007). Entretanto, essa suposição pode não ser totalmente aplicável aos polipeptídeos. Algumas substituições de nucleotídeos podem ter um efeito potencialmente desfavorável à função proteica, o qual é compensado por uma ou mais substituições em outras posições da sequência gênica (i.e. substituições coordenadas ou correlacionadas) (Hughes e Yeager, 1997; Pazos et al., 1997). Uma proporção relativamente alta de substituições coordenadas talvez promova erros significativos na análise filogenética e, conseqüentemente, em uma topologia incorreta da árvore filogenética (Sherbakov e Triboy, 2007). No presente estudo, a mesma topologia para as árvores baseadas em nucleotídeos e para as árvores baseadas em aminoácidos foi obtida após análise das cepas G3P[3]. Esses resultados reforçam a existência de uma relação genética estável entre essas cepas.

É importante destacar, que as cepas G3P[3] não permanecem em circulação nos hospedeiros humanos. Esse fato sugere que essas cepas ainda não atingiram a aptidão necessária para se tornarem um patógeno humano bem sucedido. Outro dado interessante é o fato de que todas as infecções causadas por G3P[3] detectadas até o momento em seres humanos foram identificadas em crianças. Portanto, pode-se sugerir que esse grupo etário talvez esteja mais exposto à infecção por essas cepas do que os adultos, provavelmente devido ao contato íntimo que as crianças estabelecem com seus animais de estimação associado a hábitos limitados de higiene característico da idade. Uma hipótese alternativa pode ser o fato de G3P[3] causar uma infecção subclínica em adultos ou, ainda, que infecções anteriores causadas por RVA possam conferir algum tipo de proteção contra os sintomas (Grant et al., 2011). Investigações sorológicas específicas contra anticorpos G3P[3] poderiam esclarecer ou trazer novos conhecimentos sobre esse assunto.

A vacina monovalente contra RVA (RotarixTM) faz parte do calendário vacinal brasileiro desde 2006 (Gurgel et al., 2008). A pressão seletiva vacinal poderá intensificar a circulação de cepas não usuais de RVA, reduzindo a eficácia da vacina (Grant et al., 2011). Frente a essa situação, a vigilância dos

genótipos de RVA é crucial para a avaliação do impacto vacinal ao longo do tempo. Ainda, as últimas infecções causadas por G3P[3] no Estado de São Paulo foram detectadas entre 1986 e 1992 (Timenetsky et al., 1994), sendo este estudo o primeiro relato de G3P[3] em mais de 20 anos de monitoramento.

Os dados obtidos a partir da análise genômica e proteica dos genes VP7 e VP4 da cepa G3P[3] IAL-R2638 dão suporte a hipótese de uma possível origem canina. Entretanto, o uso das regiões hipervariáveis dos genes VP7 e VP4 como evidências de relações evolucionárias entre cepas G3P[3] pode ser arbitrária e outras combinações talvez gerem resultados similares. Em adição, o presente estudo levanta a questão se árvores baseadas em aminoácidos poderiam ser utilizadas como uma nova abordagem no estudo da evolução dos RVA, evitando reconstruções filogenéticas incorretas.

A falta de um sistema de vigilância de RVA em animais de estimação (i.e. cães e gatos) associado ao fato de que a maioria das infecções causadas por RVA passam despercebidas nesses animais, limita a habilidade de estabelecer conexões epidemiológicas consistentes entre os casos humanos e animais (De Grazia et al., 2007; Wu et al., 2012). A presente investigação reforça a hipótese de que RVA de origem canina são capazes de transpor a barreira das espécies e demonstra que a análise molecular é essencial para a detecção dos eventos de transmissão interespecie. Ainda, a análise molecular é uma ferramenta importante para compreensão da ecologia e da evolução dos RVA.

5.1.4 Genótipo G10P[?]

O genótipo RVA G10 é uma cepa frequentemente detectada em amostras de fezes proveniente de bovinos com sintomas de gastroenterite. Essa cepa também é detectada em amostras de cavalos, porcos e carneiros, entretanto, em menor frequência quanto comparada às amostras de origem bovina (Shen et al., 1993; Alfieri et al., 2004; Gulati et al., 2007; Manuja et al., 2008; Caruzo et al., 2010; Halaihel et al., 2010; Esona et al., 2011; Badaracco et al., 2012; Malik et al., 2012). Recentemente, RVA G10 também foi detectada em amostras de fezes provenientes de avestruzes no Brasil (Silva et al., 2012). Na última década houveram inúmeros casos documentados de detecção de

cepas humanas de RVA G10 na África (Moyo et al., 2007; Armah et al., 2010; Esona et al., 2011; Tapia et al., 2012), Índia (Iturriza-Gómara et al., 2004b; Ramani et al., 2009; Mukherjee et al., 2012), Itália (Zuccotti et al., 2010; Finamore et al., 2011), Paraguai (Coluchi et al., 2002), Eslovênia (Steyer et al., 2010), Vietnã (Matsushima et al., 2012) e Brasil (Araújo et al., 2002; Volotão et al., 2006), incluindo cepas de RVA G10 que exibem relações genéticas próximas com cepas G10 de origem animal (Iturriza-Gómara et al., 2004b; Steyer et al., 2010; Matsushima et al., 2012; Mukherjee et al., 2012).

Alguns relatos revelaram que a cepa G10 pode apresentar uma circulação frequente em algumas populações em um determinado período. No sudeste da Índia, o genótipo G10 representou 95% das cepas de RVA detectadas durante a vigilância de 1999-2000 (Iturriza-Gómara et al., 2004b). No Brasil, o genótipo G10 foi a segunda cepa mais frequentemente associada aos casos de gastroenterite aguda em crianças <5 anos durante a vigilância nacional de RVA nos anos de 1996 e 1997 (Santos et al., 1998b).

Análise genética e proteica da cepa humana IAL-R2803 revelou que a mesma exibe uma possível origem bovina. Embora cepas de RVA G10 já tenham sido descritas e sequenciadas no Brasil (Santos et al., 1998; Volotão et al., 2006), essa é a primeira evidência forte de transmissão zoonótica de uma cepa G10 descrita no país. É importante ressaltar que um ou mais dos seus outros segmentos de RNA podem possuir origem humana, tornando-a um híbrido humano-animal. A caracterização genética de outros genes da cepa IAL-R2803 é fundamental para que o seu padrão genético completo possa ser revelado. A caracterização do genoma completo dos RVA é recomendado pelo Grupo de Trabalho de Classificação de Rotavírus (*Rotavirus Classification Working Group-RCWG*) (Matthijssens et al., 2008b), a qual possibilita uma análise mais ampla dos dados gerados pelas sequências obtidas (Esona et al., 2011).

Em relação ao gene VP4 da cepa humana IAL-R2803, inúmeras tentativas para a identificação do genótipo P foram realizadas, infelizmente, todas sem sucesso. Dessa forma, foi impossível obter mais dados genéticos que auxiliassem no esclarecimento da possível origem dessa cepa. A falha na identificação do genótipo P da cepa IAL-R2803 pela RT-PCR pode ser explicada por alguns fatores: ausência do segmento VP4, qualidade da

amostra ou pela variação dos sítios de ligação dos primers específicos utilizados, os quais foram desenhados no início dos anos 1990 e baseados em sequências de poucas cepas disponíveis (Gouvea et al., 1990; Gentsch et al., 1992; Gouvea et al., 1994b). Falha na genotipagem, genotipagem errada, uso de diversos conjuntos de primers simultaneamente e o desenho de pares de primers específicos para cepas locais já foram descritos em diferentes regiões do globo (Iturriza-Gomara et al., 2000; Fischer et al., 2003; Rahman et al., 2005b; Esona et al., 2010c). O monitoramento dos métodos de genotipagem dos RVA é extremamente importante devido à variação natural que ocorre nas sequências gênicas de suas cepas (Esona et al., 2010c).

Os fatores que promovem a transmissão interespecie são pouco compreendidos e, provavelmente, o contato próximo entre humanos e animais deva facilitar a infecção cruzada (Palombo et al., 2002). Em regiões rurais do Brasil (i.e. Presidente Prudente), animais domésticos e humanos vivem em contato próximo. Ainda, a região de Presidente Prudente é conhecida por seu grande rebanho bovino. Os dados disponíveis em literatura sobre a circulação de cepas de RVA em gado no Brasil demonstram que os genótipos G6 e G10 são os mais frequentemente detectados nos rebanhos das regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do país (Alfieri et al., 2004; Caruzo et al., 2010). Alguns estudos sugerem que o genótipo G6 é mais comumente detectado em gado de corte, enquanto o genótipo G10 é mais frequente em gado leiteiro. Na Índia, o genótipo G10 é mais prevalente que o G6, provavelmente devido ao seu característico rebanho leiteiro (Varshney et al., 2002). Animais de fazenda e humanos geralmente compartilham uma fonte de água comum, aumentando a possibilidade de ocorrer transmissão interespecie e infecções mistas por RVA (Esona et al., 2010b). Frente a essas considerações não seria uma surpresa a detecção de uma cepa G10 bovina, sabidamente circulante no rebanho da região, em uma criança habitante da mesma localidade. Infelizmente, amostras de fezes do gado da região não foram coletadas simultaneamente à detecção da cepa G10 no paciente, impossibilitando a investigação da presença de RVAs nesses animais.

O monitoramento dos genótipos G e P que infectam populações bovinas é importante para que se possa compreender a ecologia dos RVA e os mecanismos pelos quais esses vírus conseguem transpor a barreira das

espécies e trocar genes durante os rearranjos (Malik et al., 2012). Recentemente, Caruzo et al. (2010) detectou genótipos P característicos de humanos (i. e. P[4] e P[6]) em fezes de gado no Brasil, inclusive associados ao genótipo G10. A combinação G10P[6] também já foi documentada em crianças hospitalizadas em Ghana (Armah et al., 2010). Esses dados juntos não apenas sugerem a ocorrência de co-infecções e rearranjos entre cepas humanas e bovinas (Armah et al., 2010; Caruzo et al., 2010), como também suportam a hipótese de transmissão bidirecional de cepas de RVA entre humanos e animais, originando novas cepas e/ou associações.

O sítio potencial de glicosilação N da proteína VP7 esta localizado na posição 69 na cepa IAL-R2803, o qual tende a ser conservado em todas as cepas de RVA (Martella et al., 2003). A substituição do aminoácido na posição 91^{N→T} ocorreu dentro da região hipervariável B (aminoácidos 87 a 101), um dos três principais sítios antigênicos da proteína. Essa substituição pode modificar a antigenicidade da região B e, talvez, alterar a interação do vírus com o sistema imune do hospedeiro. O impacto preciso de tais substituições não pode ser determinado apenas com base em informações genéticas (Zeller et al., 2012) e estudos que visem correlacionar as diferenças nucleotídicas com as características antigênicas das cepas são extremamente importantes (Jin et al., 1996; Hoshino et al., 2004).

O presente trabalho propõe a construção de árvores baseadas em aminoácidos como uma estratégia para auxiliar o estudo das relações genéticas entre cepas de RVA G10. De fato, essa estratégia permitiu reconhecer diferenças particulares entre a árvore baseada em nucleotídeos e a árvore baseada em aminoácidos. A árvore baseada em aminoácidos das cepas G10 possibilitou a identificação de um terceiro grupo geneticamente relacionado (chamado nesse estudo de grupo C), além do desaparecimento de duas linhagens (linhagens V e VII), quando comparada à árvore baseada em nucleotídeos. Linhagens de cepas G10 já foram descritas anteriormente (Esona et al., 2010b). O presente estudo mostrou que algumas relações filogenéticas estão totalmente preservadas (i.e. linhagens III e IV), enquanto outras, apenas parcialmente (i.e. linhagem VIII).

A principal hipótese na base dos métodos de análise filogenética é de que todas as alterações nucleotídicas acarretam em evolução de forma

independente umas das outras (Sherbakov e Triboy, 2007). Entretanto, essa suposição pode não ser totalmente aplicável aos polipeptídeos. Algumas substituições de nucleotídeos podem ter um efeito potencialmente desfavorável à função proteica, o qual é compensado por uma ou mais substituições em outras posições da sequência gênica (i.e. substituições coordenadas ou correlacionadas) (Hughes e Yeager, 1997; Pazos et al., 1997). Uma proporção relativamente alta de substituições coordenadas talvez promova erros significativos na análise filogenética e, conseqüentemente, em uma topologia incorreta da árvore filogenética (Sherbakov e Triboy, 2007). Dessa forma, árvores baseadas em aminoácidos podem representar melhor a realidade (Matsuda et al., 1995). Entretanto, o valor evolucionário desse achado permanece obscuro.

A detecção de uma cepa de RVA G10 com origem bovina em uma criança com diarreia no Brasil contribui para a localização global desse genótipo. Sabe-se que cepas de origem animal apresentam uma habilidade limitada para se disseminar de forma eficiente em populações humanas, entretanto é necessário a realização de uma vigilância continuada da prevalência dessa cepa G10 derivada de animal associada a gastroenterite aguda no país. A vacina *Lanzhou Lamb RVA* (LLR) composta pela cepa G10P[15] esta licenciada na China desde 2000. Essa vacina se mostrou eficaz contra infecções por RVA, contudo esses resultados não foram confirmados por estudos pós implantação vacinal (Ward et al., 2008). O monitoramento dos genótipos de RVA é essencial para a identificação de cepas emergentes e/ou vacinais e contribui de forma fundamental para o desenvolvimento de novas vacinas contra RVA, assim como para se avaliar o impacto das vacinas empregadas atualmente (Zuccotti et al., 2010; Grant et al., 2011). A pressão vacinal seletiva pode aumentar a circulação de cepas incomuns e acarretar em uma redução da eficácia vacinal *per se* (Matthijnsens et al., 2009; Grant et al., 2011). A vigilância dos genótipos de RVA também mostram que cepas de origem animal contribuem de forma efetiva na diversidade das cepas que infectam humanos (Matthijnsens et al., 2010) e podem constituir uma fonte importante de geração de diversidade sob pressão vacinal (Matthijnsens et al., 2009; Grant et al., 2011).

No Brasil, o sistema de vigilância dos genótipos RVA foi intensificado

após a introdução da Rotarix™ no PNI, visando avaliar o impacto vacinal na população brasileira. Essa intensificação no monitoramento das infecções por RVA juntamente com o desenvolvimento de novas tecnologias talvez tenha contribuído para o aumento da detecção de cepas raras ou não usuais nos últimos anos. Há uma necessidade urgente de se incluir animais domésticos e de estimação nos programas de monitoramento de cepas de RVA devido ao seu contato próximo com humanos (principalmente em áreas rurais), acúmulo no número de relatos de detecção de cepas características de animais em populações humanas e o aumento da disseminação e isolamento de genótipos G e P não comuns (Esona et al., 2010b; Mukherjee et al., 2012). O sequenciamento de genes de RVA de origem animal e humana é fundamental para que se possa compreender melhor como os rearranjos e a transmissão interespecie contribui para a diversidade das cepas. Ainda, o presente trabalho sugere o uso de árvores baseadas em aminoácidos como uma estratégia para auxiliar o estudo da evolução dos RVA, evitando construções filogenéticas incorretas.

5.2 Rotavírus do grupo C

RVC foi inicialmente descrito como agente causador de diarreia em suínos na década de 80 (Saif et al., 1980; Kim et al., 1999; Martella et al., 2007a; Collins et al., 2008; Jeong et al., 2009; Médici et al., 2010) e, posteriormente, associado a casos esporádicos e surtos de gastroenterite aguda acometendo humanos no mundo todo (Bridger et al., 1986; Peñaranda et al., 1989; Caul et al., 1990; Maunula et al., 1992; Oishi et al., 1993; Jiang et al., 1995; Kuzuya et al., 1998; Souza et al., 1998; Teixeira et al., 1998; Castello et al., 2000; Nilsson et al., 2000b; Castello et al., 2002; Phan et al., 2004; Schnagl et al., 2004; Rahman et al., 2005a; Bányai et al., 2006; Steyer et al., 2006; Abid et al 2007; Kuzuya et al., 2007; Khamrin et al., 2008; Castello et al 2009a; Medici et al., 2009).

Um dos objetivos do presente estudo foi investigar a frequência da infecção por RVC na população das regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil. RVC foi detectado em 0,2% (15/6196) dos casos esporádicos e surtos localizados de gastroenterite aguda acometendo crianças e adultos

provenientes do Estado de Goiás e de regiões do interior do Estado de São Paulo entre Dezembro de 2007 e Setembro de 2008, durante a vigilância nacional dos RV no período compreendido entre Junho de 2007 a Junho de 2012. RVC já foi descrito anteriormente em diferentes regiões do país (Gabbay et al., 1989; Timenetsky et al., 1993; Souza et al., 1998; Teixeira et al., 1998; Araújo et al., 2011), entretanto não era detectado no Estado de São Paulo e na região Centro-Oeste do país desde 1993 e 1994, respectivamente (Souza et al., 1998; Teixeira et al., 1998).

A frequência de 0,2% obtida no presente estudo foi inferior àquela observada em Bangladesh (1,5%) durante uma investigação conduzida entre Julho e Dezembro de 2003 (Rahman et al., 2005a). O RVC foi detectado em ~0,1% (8/6196) dos casos acometendo crianças ≤ 15 anos, frequência similar àquela encontrada em populações pediátricas da Coreia do Sul (0,7%) (Moon et al., 2011), Tailândia (0,4%) (Khamrin et al., 2008), Hungria (0,6%) (Bányai et al., 2006) e Turquia (0,8%) (Mitui et al., 2009). Entretanto, a frequência de detecção foi menor quando comparada à Nigéria (1,8%) (Adah et al., 2002), Argentina (2,8%) (Castello et al., 2002), Espanha (16%) (Sánchez-Fauquier et al., 2003), Malawi (3,3%) (Cunliffe et al., 2001) e Japão (1,2%) (Kuzuya et al., 2007).

A baixa positividade de RVC obtida impossibilitou reconhecer a sazonalidade desse vírus no Brasil (como identificado nas infecções causadas por RVA). Não há relatos disponíveis que mostrem claramente a distribuição sazonal das infecções por RVC em humanos (Meleg et al., 2008). Estudos conduzidos no Japão sugerem que o RVC é mais comumente detectado nos meses mais frios (Kuzuya et al., 1998; Phan et al., 2004; Kumazaki e Usuku, 2013). No Brasil, sugere-se que as infecções por RVC sejam mais comuns na estação seca do ano, assim como o que ocorre com os RVA (Teixeira et al., 1998). A sazonalidade das infecções por RVC nos animais também não está clara. Jeong et al. (2009) descreve que a infecção por RVC em suínos é mais comumente detectada durante o período de primavera e inverno na Coreia do Sul. Por sua vez, o estudo conduzido por Amimo et al. (2013) não conseguiu identificar um padrão sazonal das infecções por RVC em suínos nos EUA, embora, aparentemente, essas infecções ocorram de forma mais comum no verão. Estudos epidemiológicos em todo mundo são necessários para que se

possa realmente reconhecer o padrão sazonal das infecções por RVC tanto em humanos quanto em animais.

É importante intensificar o sistema de vigilância laboratorial no monitoramento das infecções causadas por RVC, principalmente após a introdução da vacina contra RVA no PNI em 2006, a qual promoveu uma redução nos casos de gastroenterite aguda e diminuiu significativamente a frequência de detecção de RVA (Gurgel et al., 2008). A presente investigação não sugere que o RVC atualmente exerça um papel epidemiológico importante nos casos de gastroenterite aguda causada por RV no Brasil, mesmo após a introdução vacinal. De fato, a taxa de detecção de RVC caiu a 0% a partir de 2009.

A detecção ou incidência de RVC em adultos é raramente investigada (Nilsson et al., 2000a; Rahman et al., 2005a; Araújo et al., 2011). Em nosso estudo a frequência de detecção de RVC em adultos (>15 anos) foi de ~0,1% (7/6196). No estudo conduzido por Nilsson et al. (2000a) na Suécia entre Outubro de 1996 e Setembro de 1997, RVC foi detectado em 1% dos casos de diarreia em adultos. Esses dados juntos indicam que infecções sintomáticas causadas por RVC também ocorrem em adultos e com uma frequência similar àquela encontrada em crianças.

Embora as taxas de detecção de antígeno de RVC obtidas nas distintas investigações conduzidas sejam baixas (Nilsson et al., 2000a; Cunliffe et al., 2001; Adah et al., 2002; Castello et al., 2002; Sánchez-Fauquier et al., 2003; Rahman et al., 2005a; Kuzuya et al., 2007; Mitui et al., 2009; Moon et al., 2011), estudos soropidemiológicos demonstram que o RVC é muito mais frequente na população (James et al., 1997; Kuzuya et al., 1998; Nilsson et al., 2000b; Kuzuya et al., 2001). A soroprevalência do RVC pode variar de 30% a 66% em distintas regiões do globo (Riepenhoff-Talty et al., 1997; Steele e James, 1999; Nilsson et al., 2000b; Kuzuya et al., 2001; Iturriza-Gómara et al., 2004a), inclusive no Brasil (Cox et al., 1998).

Essa discrepância pode ser decorrente do fato das investigações sobre agentes etiológicos envolvidos em gastroenterite aguda focarem principalmente crianças na primeira infância, as quais não seriam, necessariamente, o grupo alvo do RVC (Nilsson et al., 2000b). A gastroenterite causada por RVA atinge principalmente crianças <3 anos de idade, enquanto o RVC infecta crianças

mais velhas (>5 anos) e adultos (Kuzuya et al., 1998; Nilsson et al., 2000a; Nilsson et al., 2000b; Kuzuya et al., 2001; Iturriza-Gómara et al., 2004; Castello et al., 2009a). Frente a essas considerações, é possível que a baixa porcentagem de RVC observada no presente estudo seja decorrente do elevado número de amostras provenientes de crianças ≤ 5 anos (68%, 4213/6196) presentes no grupo amostral utilizado.

A média de idade dos pacientes acometidos por RVC no presente estudo foi de 16,9 anos, concordando com as investigações soroepidemiológicas e os dados de detecção direta, os quais sugerem uma diferença na distribuição da idade das crianças com diarreia causada por RVA e RVC (Kumazaki e Usuku, 2013). Ainda, os estudos soroepidemiológicos indicam que existe um aumento progressivo na soropositividade conforme a idade (James et al., 1997; Kuzuya et al., 2001).

A discrepância etária observada também pode ser decorrente do fato das infecções por RVC acometerem principalmente adultos, grupo etário que raramente busca diagnóstico e tratamento para doenças entéricas (Bridger et al., 1986; Tsunemitsu et al., 1992a; Steyer et al., 2006). Especula-se ainda que a diferença nas prevalências das faixas etárias acometidas pelo RVC também possa ser resultado de uma possível proteção cruzada entre RVA e RVC (Jiang et al., 1995; James et al., 1997; Sanchez-Fauquier et al., 2003). Vale ressaltar que os casos de RVC podem ainda passar despercebidos. Isso se deve pelo fato da gastroenterite causada por RVC apresentar um quadro sintomatológico mais brando (quando comparado ao RVA) e, raramente, requerer hospitalização (Bányai et al., 2006).

A incidência da doença diarreica associada ao RVC ainda não pôde ser totalmente esclarecida devido à falta de uma metodologia sensível à sua detecção disponível para uso nos laboratórios clínicos (Castello et al., 2000). O diagnóstico dos RVC é limitado principalmente pelo fato dos EIAs comerciais não reconhecerem seu antígeno de grupo específico, a proteína VP6 (Jiang et al., 1995; Kuzuya et al., 1996). A utilização do RT-PCR usando primers específicos para o diagnóstico dos RVC é uma opção sensível e conveniente (Gouvea et al., 1991; Castello et al 2000), entretanto não pode ser amplamente empregada devido ao seu alto custo (Gabbay et al., 2008). Ainda, Abid et al. (2007) relataram que 31% das amostras fecais coletadas num estudo

conduzido na Espanha continham inibidores da reação de RT-PCR. Embora a detecção de RVC utilizando a técnica de EGPA necessite da presença de pelo menos 10^8 - 10^{10} partículas virais/mL para a obtenção de um resultado positivo (Jiang et al., 1995; Kuzuya et al., 1996; Castello et al., 2000; Gabbay et al., 2008), essa metodologia tem se mostrado sensível o suficiente para ser empregada no diagnóstico dos RVC com baixo custo e livre da ação de inibidores.

Existem inúmeras questões não resolvidas sobre a ecologia e a epidemiologia dos RVC, principalmente devido ao número escasso de amostras positivas e a falta de uma metodologia sensível para o seu diagnóstico (Castello et al., 2000), além de seu padrão esporádico de detecção. O desenvolvimento de novas ferramentas diagnósticas pode acarretar no aumento da detecção de RVC em amostras fecais e contribuir para o esclarecimento da epidemiologia e da doença associada a esse vírus em humanos (Clark et al., 2009).

As investigações sorológicas sugerem que a incidência de RVC seja maior em populações rurais do que em populações urbanas (Iturriza-Gómara et al., 2004a; Mukhopadhyaya et al., 2010). Um padrão similar foi observado no presente estudo, no qual todas as amostras positivas foram coletadas de pacientes originários de regiões rurais. Todavia, não existe informação sorológica sobre a incidência de RVC nas diferentes regiões geográficas do Brasil. Ainda, uma possível fonte comum das infecções causadas por RVC não pôde ser identificada durante a condução desse estudo.

O padrão esporádico de detecção de RVC e os relatos de surtos localizados podem ser interpretados como uma re-introdução de cepas de RVC a partir de uma fonte ou reservatório não identificado (Bányai et al., 2006). Recentemente foram descritas evidências genéticas de transmissão interespecie e/ou rearranjos entre cepas de RVC de origem porcina e bovina (Jeong et al., 2009) e entre cepas porcinas e humanas (Gabbay et al., 2008; Yamamoto et al., 2011). A possibilidade de ocorrência de transmissão zoonótica também foi postulada com base na elevada soroprevalência de RVC em populações humanas oriundas de regiões rurais (Iturriza-Gómara et al., 2004a). No Brasil, Gabbay et al. (2008) documentou a detecção de uma cepa de RVC de origem suína em crianças no Estado de Belém do Pará e incluiu o

RVC na lista de vírus com potencial zoonótico emergente na infecção de humanos.

Apesar do RVC já ter sido detectado em humanos diversas vezes no país (Gabbay et al., 1989; Timenetsky et al., 1993; Teixeira et al., 1998; Souza et al., 1998; Gabbay et al., 1999), existe pouca informação genética sobre suas cepas (Gabbay et al., 2008; Araújo et al., 2011). Frente a essas considerações, cepas de RVC previamente detectadas pelo NDE em 1988 e 1993 (série histórica) foram incluídas no sequenciamento e análise filogenética conduzidos no presente estudo.

Estudos evolucionários demonstraram um alto grau de conservação entre as cepas humanas (Martella, 2007b) e baixa similaridade com cepas de RVC de origem animal, ainda que alguns genes de RVC derivado de animais já tenham sido identificados em amostras humanas (Schnagl et al., 2004; Rahman et al., 2005; Kuzuya et al., 2007; Mitui et al., 2009). A comparação entre sequências de RVC também sugere que exista uma diversidade genética entre os isolados humanos, embora relativamente menor que aquela encontrada nos RVA (Rahman et al., 2005). Nesse estudo, as sequências parciais dos genes VP7, VP4, VP6 e NSP4 de cepas de RVC foram analisadas.

Ainda não foi estabelecido um sistema formal de classificação para RVC, entretanto, até o momento, 9 genótipos G e 3 genótipos P foram identificados utilizando a análise comparativa de sequências de cepas de RVC de origem humana e animal (Jiang et al., 1999; Rahman et al., 2005; Martella et al. 2007b; Yamamoto et al., 2011; Marthaler et al., 2013). Com base nos genes VP7 e VP4 descritos até o momento, todas as cepas humanas de RVC são classificadas em um único genótipo G (G4) e P (P[2]), o qual é distinto dos genótipos descritos para RVC suínos e bovinos (Jiang et al., 1999; Martella et al., 2007b; Marthaler et al., 2013). Dessa forma, sugere-se que uma cepa de RVC geneticamente exclusiva seja prevalente entre os humanos (Yamamoto et al., 2011). O presente estudo não é uma exceção à essa hipótese. Todas as cepas de RVC detectadas e analisadas, tanto da série histórica (1988 e 1993) quanto recentes (2007-2008), foram classificadas como genótipo G4P[2], corroborando a natureza altamente conservada dos genes VP7 e VP4. Levando-se em consideração que alguns isolados foram identificados dentro de um intervalo maior que 10 anos, propõe-se que a taxa de mutação associada a

esses vírus seja muito baixa (Castello et al 2000).

Os sítios potenciais de glicosilação N da proteína VP7 localizados nas posições 67-69, 152-154 e 225-227 (Martella et al., 2007b; Collins et al., 2008) não puderam ser verificados, uma vez que encontram-se fora da porção do gene que foi amplificada. A substituição do aminoácido na posição 255^{I→V} ocorreu dentro da região variável VR-8 (aminoácidos 244 a 259), um dos 8 sítios antigênicos da proteína VP7, na cepa histórica IAL-RC76 (1988) e nas cepas recentes IAL-RC01, IAL-RC09, IAL-RC12, IAL-RC22, IAL-RC29-37, IAL-RC43 e IAL-RC59 (2007-2008). Essa substituição pode modificar a antigenicidade da região VR-8 e, talvez, alterar a interação do vírus com o sistema imune do hospedeiro. O impacto preciso de tais substituições não pode ser determinado apenas com base em informações genéticas (Zeller et al., 2012) e estudos que visem correlacionar as diferenças nucleotídicas com as características antigênicas das cepas são extremamente importantes (Jin et al., 1996; Hoshino et al., 2004).

A clivagem da espícula VP4 pela tripsina em dois polipetídeos, VP8* e VP5*, é necessária para a ativação da infectividade do RVA (Gorziglia et al., 1988), assim como no RVC (Jiang et al., 1999). Os sítios potenciais de clivagem da VP4 localizados nas lisinas das posições 231, 239, 241, 244, 247 e 248 estão mantidos nas cepas humanas IAL-RC, garantindo sua infectividade. Entretanto, a substituição do aminoácido na posição 243^{M→I} nas cepas IAL-RC09, IAL-RC12, IAL-RC22, IAL-RC30, IAL-RC31, IAL-RC33, IAL-RC34, IAL-RC36, IAL-RC43 e IAL-RC59 (série recente) ocorreu dentro do domínio catalítico de clivagem (aminoácidos 231 a 250). Essa substituição pode modificar as características da região correspondente e, talvez, alterar a eficiência da clivagem pelas enzimas proteolíticas.

Um alto grau de identidade também foi observado entre as cepas IAL-RC RVC na proteína VP6, as quais foram classificadas no genótipo humano I2 (Yamamoto et al., 2011). Esse resultado sugere que as cepas IAL-RC compartilham o ancestral comum aventado para a linhagem humana de RVC (Martella., 2007b; Yamamoto et al., 2011). Os três primers utilizados na reação de sequenciamento (C1, C3 e C4) foram desenhados com base na porção 3' terminal conservada (nucleotídeos 994-1349) da proteína VP6 (Gouvea et al., 1991), impossibilitando a análise comparativa dos cepas humanas IAL-RC com

a cepas protótipos nas regiões conservadas do gene (Jiang et al., 1992).

Contudo, a homogeneidade genética dos RVC humanos parece não ser corroborada pela análise do genoma completo dos RVC (Martella et al., 2007b; Médici et al., 2010; Yamamoto et al 2011; Kumazaki e Usuku, 2013). Todas as cepas IAL-RC RVC analisadas no presente estudo foram identificadas como pertencentes à linhagem humana E2 da proteína NSP4 (Yamamoto et al., 2011). Entretanto, a análise da sequência parcial do gene NSP4 indicou a existência de dois grupos geneticamente distintos de cepas humanas de RVC. A proteína NSP4 é extensivamente estudada devido ao seu envolvimento na morfogênese viral, além do seu potencial enterotoxigênico (Ball et al., 1996; Sánchez-Fauquier et al., 2003). Cepas brasileiras de RVC NSP4 isoladas em diversos anos foram divididas em dois subgrupos (Subgrupo I e II) geneticamente distantes (71,1-75,1% nt; 29-36% aa), o que contribui para a hipótese de que as cepas de RVC humanas apresentam heterogeneidade genética. A heterogeneidade do gene NSP4 já foi observado anteriormente por Araújo et al. (2011) analisando cepas humanas de RVC provenientes de quatro Estados brasileiros (Rio de Janeiro, Bahia, Rio Grande do Sul e Minas Gerais). Todavia, as cepas humanas brasileiras IAL-RC NSP4 de RVC que circulam no Estado de São Paulo em diferentes anos (históricas e recentes) são geneticamente distantes daquelas descritas nos outros Estados por Araújo et al. (2011), sugerindo a circulação de pelo menos dois perfis genéticos diferentes do gene NSP4 dos RVC no país. É improvável que uma mutação significativa tenha ocorrido somente no gene NSP4 e em período de tempo tão curto. É mais provável que o gene NSP4 tenha sido substituído por outro gene NSP4 durante um rearranjo natural (Kumazaki e Usuku, 2013). A ocorrência de rearranjos entre cepas de RVC de origem animal e humana ou a partir de uma cepa de RVC humana não identificada pertencente a um novo genogrupo já foi descrita anteriormente (Yamamoto et al., 2011).

Ainda, a elevada diversidade genética no gene NSP4 também foi recentemente descrita para RVC humanos detectados na Ásia (Yamamoto et al., 2011; Kumazaki e Usuku, 2013). Esses dados juntos indicam que uma diversidade genética adicional nas cepas de RVC NSP4 espalhadas pelo mundo deve ser esperada. Aparentemente, a heterogeneidade descrita para o gene NSP4 dos RVC é semelhante àquela reportada para RVA e RVB

(Yamamoto et al 2011). A análise molecular conduzida no presente estudo indicou que um grupo de cepas humanas brasileiras de RVC NSP4 (provisoriamente denominadas Subgrupo II) não agrupou com nenhuma cepa de NSP4 descrita anteriormente. A análise molecular realizada com as sequências parciais do gene VP6 conduzida no presente estudo (Figura 46), sugere que as cepas de RVC humanas brasileiras descritas por Araújo et al. (2011) tendem a se reunir em um grupo genético distinto das demais cepas humanas brasileiras IAL-RC detectadas no Estado de São Paulo. Entretanto, as cepas descritas por Araújo et al. (2011) se agrupam junto com cepas humanas de RVC VP6 previamente isoladas em diferentes regiões do globo. Embora localizado no mesmo gene, o uso de primers direcionados a alvos diferentes na reação de RT-PCR, impossibilitou o alinhamento e a compração das sequências parciais dos genes VP7 e VP4 das amostras IAL-RC com as cepas humanas brasileiras de RVC previamente descritas por Araújo et al. (2011). Consequentemente, não foi possível verificar se as sequências dos genes VP4 e VP7 provenientes das mesmas amostras também estariam separadas em dois subgrupos geneticamente distintos. Análises epidemiológicas e moleculares mais robustas utilizando RVC humanos de todo o mundo são necessárias para que se possa entender a diversidade desse vírus e esclarecer sua evolução, assim como estabelecer sistemas de classificação. Ainda, essas análises poderão elucidar se o Subgrupo II da proteína NSP4 identificado no presente estudo representa um subgrupo exclusivo dentro das cepas humanas de RVC com circulação limitada, aparentemente confinada ao Brasil.

Os sítios potenciais de glicosilação N da proteína NSP4 estão presentes nas cepas IAL-RC e tendem a ser conservados em todas as cepas de RVC (Horie et al., 1997). A substituição do aminoácido na posição 49^{H→N} ocorreu dentro do domínio hidrofóbico H3 (aminoácidos 39 a 51), um dos dois domínios hidrofóbicos da proteína NSP4 (Horie et al., 1997; Sasaki et al., 2001), em todas as cepas IAL-RC, com exceção das cepas IAL-RC26 e IAL-RC27 detectadas no surto ocorrido na cidade de Valentim Gentil em 1993. Essas zonas hidrofóbicas têm a função de conduzir a proteína até o retículo endoplasmático, onde é glicosilada (Mattion et al., 1994). Essa substituição pode modificar as características da região correspondente, alterando a

eficiência do transporte até o retículo endoplasmático e impedindo sua glicosilação. Entretanto, o impacto preciso de tais substituições não pode ser determinado apenas com base em informações genéticas (Zeller et al., 2012).

A análise filogenética baseada na sequência parcial dos genes VP6, VP7, VP4 e NSP4 mostraram que as cepas humanas IAL-RC detectadas em 1988 e 1993 agruparam junto com cepas provenientes de diversos países e continentes coletadas entre os anos de 1988 e 2010 (Reino Unido, Espanha, Argentina, China, Austrália, Japão, Brasil, Índia, Eslovênia, Coreia do Sul e Bangladesh) (Cook et al., 1991; Fielding et al., 1994; Grice et al., 1994; Jiang et al., 1996; Wu et al., 1998; Rahman et al., 2005; Steyer et al., 2006; Abid et al., 2007; Kuzuya et al., 2007; Gabbay et al., 2008; Castello et al., 2009a; Araújo et al., 2011; Yamamoto et al., 2011; Baek et al., 2013). Esses resultados sugerem que as cepas humanas históricas de RVC que circulavam no Estado de São Paulo estão geneticamente relacionadas com as demais cepas de RVC que ainda circulam ao redor do mundo e, portanto, não há evidência da introdução de uma variante genética em particular no Estado durante esse período.

Por outro lado, é importante salientar que todos os 4 genes (VP6, VP7, VP4 e NSP4) das cepas IAL-RC isoladas mais recentemente (2007-2008), embora não formem um grupo monofilético, exibem uma relação filogenética mais próxima com cepas de RVC humanas detectadas na China e no Japão entre 1991 e 2011, do que com as demais cepas detectadas no mundo (Jiang et al., 1996; Kuzuya et al., 2003; Yamamoto et al., 2011; Kumazaki e Usuku, 2013). Esse padrão filogenético sugere que essas cepas de RVC estão geneticamente ligadas e que está ocorrendo um fluxo gênico entre o Brasil e esses dois países asiáticos. Cepas provenientes de regiões geográficas distantes que exibem uma relação genética próxima podem possuir uma origem comum (Castello et al., 2009b). Entretanto, é importante levar em consideração que não existe número suficiente de sequências disponíveis nas bases de dados capaz de confirmar tal hipótese, além do fato das sequências de RVC dos genes VP7, VP4, VP6 e NSP4 à disposição no *GenBank* não serem representativas dos isolados globais.

Estima-se que atualmente vivem no Brasil cerca de 200 mil chineses e descendentes, dos quais um número superior a 120 mil moram na grande São Paulo. A imigração chinesa no Brasil teve início em 1810, porém, o grande

fluxo de migração se deu a partir da década de 1950 como consequência das guerras que estavam ocorrendo no país e da adoção do regime comunista (Leite, 1999; Lesser, 2001). O Brasil abriga a maior população japonesa fora do Japão, com cerca de 1,5 milhões de nikkeis (termo usado para denominar os japoneses e seus descendentes). Durante a década de 1930 cerca de 75% dos imigrantes japoneses foram para São Paulo, Estado que tinha grande necessidade de mão-de-obra para trabalhar nos cafezais. Na década de 1960, ocorreu um grande êxodo rural que levou a maior parte da comunidade nipo-brasileira do campo para as cidades. A cidade de São Paulo tornou-se, assim, a cidade com maior número de japoneses fora do Japão. A partir do fim dos anos 80, ocorreu uma inversão do fluxo migratório entre o Brasil e Japão. Os nipo-descendentes passaram a emigrar para o Japão à procura de melhores oportunidades de trabalho. A comunidade brasileira por sua vez, é a terceira maior comunidade de trabalhadores estrangeiros residentes no Japão (Beltrão e Sugahara, 2006). De modo curioso, uma relação genética próxima entre Brasil e Ásia também foi observada entre cepas G12 de RVA (Pietruchinski et al., 2006; Castello et al., 2009b). O fato de o fluxo migratório promover uma troca de cepas de RVC entre esses países pode ser especulado, entretanto, uma análise mais refinada dos 11 segmentos gênicos completos, ao invés de sequências parciais, é fundamental para validar tal observação.

A análise molecular das sequências parciais dos genes VP7, VP4, VP6 e NSP4 das cepas humanas IAL-RC mostrou que elas compartilham baixa identidade genética com cepas RVC animais, dados consistentes com relatos anteriores (Adah et al., 2002; Rhaman et al., 2005; Steyer et al., 2006; Abid et al., 2007; Khamrin et al., 2008; Medici et al., 2009; Mitui et al., 2009; Médici et al., 2010; Moon et al., 2011; Baek et al., 2013). As cepas humanas de RVC parecem constituir uma linhagem única suportada por altos valores de *bootstrap*, independentemente da região geográfica onde foram isoladas. As sequências genéticas das cepas humanas de RVC são altamente conservadas, o que sugere uma evolução recente.

No presente estudo, todas as cepas IAL-RC agruparam com outras cepas humanas de RVC e não mostraram nenhuma evidência de ancestralidade animal. Entretanto, a análise da sequência parcial da proteína VP6 mostrou que as cepas humanas semelhante a suínas isoladas em Belém,

formaram um grupo monofilético com cepa RVC suína protótipo Cowden, de acordo com o que foi identificado anteriormente por Gabbay et al. (2008). Recentemente, identificou-se uma diversidade genética significativa no gene VP3 dos RVC (Yamamoto et al., 2011). A identificação dessa diversidade sugere que o gene VP3 dos RVC humanos talvez tenha sido originado a partir de um rearranjo com cepas RVC suínas ou a partir de cepas de RVC humanas pertencentes a um novo genogrupo (Yamamoto et al., 2011). De fato, a cepa mais antiga de RVC foi coletada de porcos (Saif et al., 1980), o que sugere fortemente uma possível origem suína desse patógeno. A aquisição de genes humanos também poderia facilitar a adaptação dessa cepa na infecção desse novo hospedeiro. O fato dos RVC não permanecerem em circulação em humanos (como os RVA) pode ainda sugerir que esse vírus não tenha atingido a aptidão necessária para infectar de forma eficiente essa população. Inclusive, o estudo conduzido na Hungria por Meleg et al. (2008) mostra a detecção de RVC em amostras de esgoto, evidenciando que o vírus está em circulação, entretanto não houve correlação ou aumento significativo no número de casos esporádicos ou surtos associados ao RVC acometendo humanos na região estudada.

A ocorrência de rearranjos entre diferentes genogrupos de RV humanos ou entre RV de origem humana e animal associado à transmissão interespecie já foi muito bem documentado para os RVA, inclusive considerando-se a análise de genomas completos (Nakagomi et al., 1991; Palombo, 2002; Khamrin et al., 2006; Martella et al., 2006; Ghosh et al., 2007b; Parra et al., 2008; Tsugawa et al., 2008; Matthijnssens et al., 2010b; Ghosh et al., 2011). Por outro lado, quase não existem informações sobre as sequências nucleotídicas dos 11 genes dos RVC (Yamamoto et al., 2011; Baek et al., 2013; Soma et al., 2013). Portanto, é amplamente desconhecido se esses segmentos são totalmente semelhantes àqueles das espécies originais ou se são rearranjos provenientes de espécies distintas. O acúmulo de mais dados sobre sequências completas de RVC humano e animal é vital para a compreensão da sua evolução e elucidação da sua origem.

No presente estudo, alguns genes RVC VP4, VP6, VP7 e NSP4 não puderam ser sequenciados. Cepas RVC não genotipadas podem indicar a existência de genótipos não usuais, falha dos primers específicos utilizados

(Tiku et al., 2014), degradação do ácido nucleico nas amostras ou ineficiência do processo de extração do RNA (Esona et al., 2013; Babji et al., 2014). Entretanto, a sequência gênica altamente conservada observada entre as cepas humanas de RVC em todo o mundo (Yamamoto et al. 2011), sugere que as amostras não genotipadas pertencem ao genótipo humano comum G4P[2]-I2-E2, e que não puderam ser sequenciadas devido a incompatibilidade nucleotídica na região ligante dos primers utilizados. As sequências genômicas dos genes de RVC obtidas na presente investigação, mesmo parciais, serão capazes de fornecer conhecimento necessário para o desenvolvimento de ferramentas diagnósticas mais sensíveis e específicas, as quais poderão ser utilizadas para definir a distribuição mundial dos RVC, contribuindo para estudos evolucionários e epidemiológicos futuros.

Esse estudo também propôs a construção de árvores genealógicas baseadas em aminoácidos como uma forma de auxiliar o estudo das relações genéticas entre as cepas de RVC de origem humana e animal. A principal hipótese na base dos métodos de análise filogenética é de que todas as alterações nucleotídicas acarretam em evolução de forma independente umas das outras (Sherbakov e Triboy, 2007). Entretanto, essa suposição pode não ser totalmente aplicável aos polipeptídeos. Algumas substituições de nucleotídeos podem ter um efeito potencialmente desfavorável à função proteica, o qual é compensado por uma ou mais substituições em outras posições da sequência gênica (i.e. substituições coordenadas ou correlacionadas) (Hughes e Yeager, 1997; Pazos et al., 1997). Uma proporção relativamente alta de substituições coordenadas talvez promova erros significativos na análise filogenética e, conseqüentemente, em uma topologia incorreta da árvore filogenética (Sherbakov e Triboy, 2007). No presente estudo, a mesma topologia para as árvores baseadas em nucleotídeos e para as árvores baseadas em aminoácidos foi obtida após análise das cepas IAL-RC RVC. Esses resultados reforçam a existência de uma relação genética estável entre essas cepas.

6. CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

- Houve uma redução no número de casos de RVA confirmados por laboratório, compatível com o comportamento da doença diarreica após a introdução vacinal;
- RVA foi detectado em maior frequência no grupo etário de 6-18 anos, seguindo a tendência mundial de infectar crianças mais velhas após a implantação da vacina;
- Houve aumento na positividade de RVA em adultos como uma possível decorrência de mudanças no perfil genético de cepas de RVA comumente circulantes;
- A sazonalidade das infecções por RVA deslocou o pico de ocorrência de Junho-Agosto para Setembro. A vacinação universal pode reduzir o número de indivíduos suscetíveis, retardando, assim, o período de ocorrência do RVA e alterando seu padrão de sazonalidade;
- A predominância do genótipo G2P[4] e a emergência do genótipo G12 seguem a tendência mundial ditada pelas flutuações oscilatórias dos genótipos de RVA e, aparentemente, não estão relacionados à vacinação;
- Os resultados obtidos no presente estudo reforçam a teoria de que existem robustas interações entre os RVA de origem animal e humana e confirmam a ocorrência de transmissão interespecie (ou zoonótica) entre cepas de RVA;
- O conhecimento sobre a distribuição dos genótipos G e P, incluindo a detecção de genótipos emergentes, raros e não usuais, é crucial para os programas de vacinação contra RVA e para o desenvolvimento de novas vacinas;
- A frequência de positividade obtida para RVC foi baixa, sugerindo que esse

vírus, atualmente, não exerce um papel epidemiológico importante nos casos de gastroenterite aguda causada por RV no Brasil, mesmo após a introdução da vacina;

- A análise molecular das sequências parciais dos genes VP7, VP4, VP6 e NSP4 das cepas humanas IAL-RC RVC mostrou que elas compartilham alta identidade genética com as demais cepas humanas circulantes mundialmente, e não há nenhuma evidência de ancestralidade animal;

- O presente trabalho sugere o uso de árvores baseadas em aminoácidos como uma estratégia para auxiliar o estudo da evolução dos RV, evitando construções filogenéticas incorretas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abe M, Yamasaki A, Ito N, Mizoguchi T, Asano M, Okano T, Sugiyama M. Molecular characterization of rotaviruses in a Japanese raccoon dog (*Nyctereutes procyonoides*) and a masked palm civet (*Paguma larvata*) in Japan. *Vet Microbiol.* 2010;146(3-4):253-9.

Abid I, Guix S, Aouni M, Pinto R, Bosch A. Detection and characterization of human group C rotavirus in the pediatric population of Barcelona, Spain. *J Clin Virol.* 2007;38(1):78-82.

Aboudy Y, Shif I, Silberstein I, Gotlieb-Stematsky T. Efficiency of isolation of human rotavirus in primary African green monkey kidney cells. *J Virol Methods.* 1989;25(3):251-7.

Aboudy Y, Shif I, Zilberstein I, Gotlieb-Stematsky T. Use of polyclonal and monoclonal antibodies and analysis of viral RNA in the detection of unusual group A human rotaviruses. *J Med Virol.* 1988;25(3):351-9.

Adah MI, Nagashima S, Wakuda M, Taniguchi K. Close relationship between G8-serotype bovine and human rotaviruses isolated in Nigeria. *J Clin Microbiol.* 2003;41(8):3945-50.

Adah MI, Wade A, Oseto M, Kuzuya M, Taniguchi K. Detection of human group C rotaviruses in Nigeria and sequence analysis of their genes encoding VP4, VP6, and VP7 proteins. *J Med Virol.* 2002;66(2):269-75.

Adah MI, Wade A, Taniguchi K. Molecular epidemiology of rotaviruses in Nigeria: detection of unusual strains with G2P[6] and G8P[1] specificities. *J Clin Microbiol.* 2001;39(11):3969-75.

Afonso A, Antunes H. Infecção por rotavirus: implicações e custos. *Acta Pediatr Port.* 2007;38:138-43.

Agrawal DK, Singh NP, Chauhan RS. Colostral antibodies against rotavirus infection in neonatal calves. *J Immunol Immunopathol.* 2002;4:107-9.

Alam MM, Kobayashi N, Ishino M, Ahmed MS, Ahmed MU, Paul SK, Muzumdar BK, Hussain Z, Wang YH, Naik TN. Genetic analysis of an ADRV-N-like novel rotavirus strain B219 detected in a sporadic case of adult diarrhea in Bangladesh. *Arch Virol*. 2007;152:199-208.

Alfieri AF, Alfieri AA, Barreiros MA, Leite JP, Richtzenhain LJ. G and P genotypes of group A rotavirus strains circulating in calves in Brazil, 1996-1999. *Vet Microbiol*. 2004;99(3-4):167-73.

Alfieri AA, Leite JP, Alfieri AF, Jiang B, Glass RI, Gentsch JR. Detection of field isolates of human and animal group C rotavirus by reverse transcription-polymerase chain reaction and digoxigenin-labeled oligonucleotide probes. *J Virol Methods*. 1999;83(1-2):35-43.

Amarilla A, Espínola EE, Galeano ME, Farina N, Russomando G, Parra GI. Rotavirus infection in the Paraguayan population from 2004 to 2005: high incidence of rotavirus strains with short electropherotype in children and adults. *Med Sci Monit*. 2007;13(7):333-7.

Amimo JO, Vlasova AN, Saif LJ. Prevalence and genetic heterogeneity of porcine group C rotaviruses in nursing and weaned piglets in Ohio, USA and identification of a potential new VP4 genotype. *Vet Microbiol*. 2013;164:27-38.

Aminu M, Page NA, Ahmad AA, Umoh JU, Dewar J, Steele AD. Diversity of rotavirus VP7 and VP4 genotypes in Northwestern Nigeria. *J Infect Dis*. 2010;202 Suppl:S198-204.

Anderson EJ, Weber SG. Rotavirus infection in adults. *Lancet Infect Dis*. 2004;4(2):91-9.

Anderson RM, May RM. Immunisation and herd immunity. *Lancet*. 1990;335(8690):641-5.

Andreasi MS, Batista SM, Tozetti IA, Ozaki CO, Nogueira MM, Fiaccadori FS, Borges AM, Santos RA, Cardoso DD. Rotavirus A among hospitalized infants, up to three years of age, with acute gastroenteritis in Campo Grande, State of Mato Grosso do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2007;40(4):411-4.

Angel J, Franco MA, Greenberg HB. Rotavirus immune responses and correlates of protection. *Curr Opin Virol.* 2012;2(4):419-25.

Antunes H, Afonso A, Iturriza M, Martinho I, Ribeiro C, Rocha S, Magalhães C, Carvalho L, Branca F, Gray J. G2P[4] the most prevalent rotavirus genotype in 2007 winter season in an European non-vaccinated population. *J Clin Virol.* 2009;45:76-8.

Araújo IT, Fialho AM, de Assis RM, Rocha M, Galvão M, Cruz CM, Ferreira MS, Leite JP. Rotavirus strain diversity in Rio de Janeiro, Brazil: characterization of VP4 and VP7 genotypes in hospitalized children. *J Trop Pediatr.* 2002;48(4):214-8.

Araújo IT, Heinemann MB, Fialho AM, Leite JP. Detection and Molecular Characterization of Human Group C Rotavirus in Brazil. *Intervirology.* 2011;54(5):261-7.

Arias CF, Dector MA, Segovia L, López T, Camacho M, Isa P, Espinosa R, López S. RNA silencing of rotavirus gene expression. *Virus Res.* 2004;102(1):43-51.

Argüelles MH, Villegas GA, Castello A, Abrami A, Ghiringhelli PD, Semorile L, Glikmann G. VP7 and VP4 genotyping of human group A rotavirus in Buenos Aires, Argentina. *J Clin Microbiol.* 2000;38(1):252-9.

Arista S, Giammanco GM, De Grazia S, Ramirez S, Lo Biundo C, Colomba C, Cascio A, Martella V. Heterogeneity and temporal dynamics of evolution of G1 human rotaviruses in a settled population. *J Virol.* 2006;80(21):10724-33.

Armah GE, Hoshino Y, Santos N, Binka F, Damanka S, Adjei R, Honma S, Tatsumi M, Manful T, Anto F. The global spread of rotavirus G10 strains: Detection in Ghanaian children hospitalized with diarrhea. *J Infect Dis.* 2010;202 Suppl:S231-8.

Armah GE, Steele AD, Binka FN, Esona MD, Asmah RH, Anto F, Brown D, Green J, Cutts F, Hall A. Changing patterns of rotavirus genotypes in Ghana: emergence of human rotavirus G9 as a major cause of diarrhea in children. *J Clin Microbiol.* 2003;41(6):2317-22.

Asano KM, Gregori F, Souza SP, Rotava D, Oliveira RN, Villarreal LY, Richtzenhain LJ, Brandão PE. Bovine rotavirus in turkeys with enteritis. *Avian Dis.* 2011;55(4):697-

700.

Babji S, Arumugam R, Sarvanabhavan A, Gentsch JR, Kang G. Approach to molecular characterization of partially and completely untyped samples in an Indian rotavirus surveillance program. *Vaccine*. 2014;32:A84-A88.

Badaracco A, Garaicoechea L, Rodríguez D, Uriarte EL, Odeón A, Bilbao G, Galarza R, Abdala A, Fernandez F, Parreño V. Bovine rotavirus strains circulating in beef and dairy herds in Argentina from 2004 to 2010. *Vet Microbiol*. 2012;158(3-4):394-9.

Badaracco A, Matthijnssens J, Romero S, Heylen E, Zeller M, Garaicoechea L, Van Ranst M, Parreño V. *Vet Microbiol*. 2013;161(3-4):247-54.

Baek IH, Than VT, Kim H, Lim I, Kim W. Full genomic characterization of a group C rotavirus isolated from a child in South Korea. *J Med Virol*. 2013;85(8):1478-84.

Baker TS, Olson NH, Fuller SD. Adding the third dimension to virus life cycles: three-dimensional reconstruction of icosahedral viruses from cryo-electron micrographs. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1999;63(4):862-922.

Ball LA. The universal taxonomy of viruses in theory and practice. In: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA, editors. *Virus Taxonomy: Eight Report of the International Committee on taxonomy of Viruses*. Elsevier, Academic Press; Amsterdam, Holland: 2005. p. 3-8.

Ball JM, Tian P, Zeng CQ, Morris AP, Estes MK. Age-dependent diarrhea induced by a rotaviral nonstructural glycoprotein. *Science*. 1996;272(5258):101-4.

Banerjee I, Iturriza-Gomara M, Rajendran P, Primrose B, Ramani S, Gray JJ, Brown DW, Kang G. Molecular characterization of G11P[25] and G3P[3] human rotavirus strains associated with asymptomatic infection in South India. *J Med Virol*. 2007;79(11):1768-74.

Bányai K, Esona MD, Kerin TK, Hull JJ, Mijatovic S, Vascónez N, Torres C, de Filippis AM, Foytich KR, Gentsch JR. Molecular characterization of a rare, human-porcine reassortant rotavirus strain, G11P[6], from Ecuador. *Arch Virol*. 2009;154(11):1823-9. Erratum in: *Arch Virol*. 2010;155(1):147.

Bányai K, Gentsch JR, Griffin DD, Holmes JL, Glass RI, Szücs G. Genetic variability among serotype G6 human rotaviruses: identification of a novel lineage isolated in Hungary. *J Med Virol.* 2003;71(1):124-34.

Bányai K, Jiang B, Bogdán A, Horvath B, Jakab F, Meleg E, Martella V, Magyar L, Iemegh B, Szucs G. Prevalence and molecular characterization of human group C rotaviruses in Hungary. *J Clin Virol.* 2006;37(4):317-22.

Bányai K, László B, Duque J, Steele AD, Nelson EA, Gentsch JR, Parashar UD. Systematic review of regional and temporal trends in global rotavirus strain diversity in the pre rotavirus vaccine era: insights for understanding the impact of rotavirus vaccination programs. *Vaccine.* 2012;30 Suppl 1:A122-30.

Bányai K, Papp H, Dandár E, Molnár P, Mihály I, Van Ranst M, Martella V, Matthijnsens J. Whole genome sequencing and phylogenetic analysis of a zoonotic human G8P[14] rotavirus strain. *Infect Genet Evol.* 2010;10(7):1140-4.

Barnes GL, Townley RR. Duodenal mucosal damage in 31 infants with gastroenteritis. *Arch Dis Child.* 1973;48(5):343-9.

Barros FC, Matijasevich A, Requejo JH, Giugliani E, Maranhão AG, Monteiro CA, Barros AJ, Bustreo F, Merialdi M, Victora CG. Recent trends in maternal, newborn, and child health in Brazil: progress toward Millennium Development Goals 4 and 5. *Am J Public Health.* 2010;100(10):1877-89.

Bass DM, Baylor MR, Chen C, Mackow EM, Bremont M, Greenberg HB. Liposome-mediated transfection of intact viral particles reveals that plasma membrane penetration determines permissivity of tissue culture cells to rotavirus. *J Clin Invest.* 1992;90(6):2313-20.

Battilani M, Murgia MV, Lavazza A, Cecchinato M, Catelli E. Molecular characterization of rotavirus found during outbreaks of transmissible enteritis in grey partridge (*Perdix perdix*): preliminary results. *Large Anim Rev.* 2003;9:111-2.

Baumeister BM, Castro AE, McGuire-Rodgers SJ, Ramsay EC. Detection and control of rotavirus infections in zoo animals. *J Am Vet Med Assoc.* 1983;183(11):1252-4.

Beards GM, Desselberger U, Flewett TH. Temporal and geographical distributions of human rotavirus serotypes, 1983 to 1988. *J Clin Microbiol.* 1989;27(12):2827-33.

Beaton GH, Martorell R, L'AbbeEffectiveness of vitamin A supplementation in the control of young child morbidity and mortality in developing countries. Toronto: International Nutrition Program; 1993.

Beltrão KI, Sugahara S. Permanentemente temporário: Dekasseguis brasileiros no Japão. *Rev Bras Estud Popul.* 2006;23:61–85.

Bhan MK, Lew JF, Sazawal S, Das BK, Gentsch JR, Glass RI. Protection conferred by neonatal rotavirus infection against subsequent rotavirus diarrhea. *J Infect Dis.* 1993;168(2):282-7.

Bilbao GN, Chacana PA, Mendiburu A, Rodriguez E, Blackhall JO, Terzolo HR. Prophylaxis of neonatal diarrhoea in dairy calves using yolk immunoglobulins (IgY). *Rev Med Vet Buenos Aires.* 2006; 87:135-9.

Birch CJ, Heath RL, Marshall JA, Liu S, Gust ID. Isolation of feline rotaviruses and their relationship to human and simian isolates by electropherotype and serotype. *J Gen Virol.* 1985;66 (Pt 12):2731-5. Erratum in: *J Gen Virol* 1986 Sep;67(Pt9):2065.

Bishop RF. Natural history of human rotavirus infection. *Arch Virol Suppl.* 1996;12:119-28.

Bishop RF, Barnes GL, Cipriani E, Lund JS. Clinical immunity after neonatal rotavirus infection. A prospective longitudinal study in young children. *N Engl J Med.* 1983;309(2):72-6.

Bishop RF, Davidson GP, Holmes IH, Ruck BJ. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. *Lancet.* 1973;2(7841):1281-3.

Bishop RF, Masendycz PJ, Bugg HC, Carlin JB, Barnes GL. Epidemiological patterns of rotaviruses causing severe gastroenteritis in young children throughout Australia from 1993 to 1996. *J Clin Microbiol.* 2001;39(3):1085-91.

Black RE, Cousens S, Johnson HL, Lawn JE, Rudan I, Bassani DG, Jha P, Campbell H, Walker CF, Cibulskis R, Eisele T, Liu L, Mathers C, Child Health Epidemiology Reference Group of WHO and UNICEF. Global, regional, and national causes of child mortality in 2008: a systematic analysis. *Lancet*. 2010;375:1969–1987.

Bohl EH, Saif LJ, Theil KWA, Agnes G, Cross RF. Porcine pararotavirus: detection, differentiation from rotavirus, and pathogenesis in gnotobiotic pigs. *J Clin Microbiol*. 1982;15(2):312-9.

Borges AM, Dias e Souza M, Fiaccadori FS, Cardoso Dd. Monitoring the circulation of rotavirus among children after the introduction of the Rotarix™ vaccine in Goiânia, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011;106(4):499-501.

Both GW, Bellamy AR, Mitchell DB. Rotavirus protein structure and function. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1994;185:67-105

Braeckman T, Van Herck K, Raes M, Vergison A, Sabbe M, Van Damme P. Rotavirus vaccines in Belgium: policy and impact. *Pediatr Infect Dis J*. 2011;30(1 Suppl):S21-4.

Brassard J, Gagné MJ, Généreux M, Côté C. Detection of human food-borne and zoonotic viruses on irrigated, field-grown strawberries. *Appl Environ Microbiol*. 2012;78(10):3763-6.

Bremont M, Juste-Lesage P, Chabanne-Vautherot D, Charpilienne A, Cohen J. Sequences of the four larger proteins of a porcine group C rotavirus and comparison with the equivalent group A rotavirus proteins. *Virology*. 1992;186(2):684-92. Erratum in: *Virology* 1992;189(1):402.

Bridger JC. Novel rotaviruses in animals and man. *Ciba Found Symp*. 1987;128:5-23.

Bridger JC, Pedley S, McCrae MA. Group C rotaviruses in humans. *J Clin Microbiol*. 1986;23(4):760-3.

Brown KH, Peerson JM, Baker SK, Hess SY. Preventive zinc supplementation among infants, preschoolers, and older prepubertal children. *Food Nutr Bull*. 2009;30:S12–S40.

Browning GF, Fitzgerald TA, Chalmers RM, Snodgrass DR. A novel group A rotavirus G serotype: serological and genomic characterization of equine isolate FI23. *J Clin Microbiol.* 1991;29(9):2043-6.

Bucardo F, Ripinger CM, Svensson L, Patton JT. Vaccine-derived NSP2 segment in rotaviruses from vaccinated children with gastroenteritis in Nicaragua. *Infect Genet Evol.* 2012;12(6):1282-94.

Burns JW, Siadat-Pajouh M, Krishnaney AA, Greenberg HB. Protective effect of rotavirus VP6-specific IgA monoclonal antibodies that lack neutralizing activity. *Science.* 1996;272(5258):104-7.

Buttery JP, Lambert SB, Grimwood K, Nissen MD, Field EJ, Macartney KK, Akikusa JD, Kelly JJ, Kirkwood CD. Reduction in rotavirus-associated acute gastroenteritis following introduction of rotavirus vaccine into Australia's National Childhood vaccine schedule. *Pediatr Infect Dis J.* 2011;30(1 Suppl):S25-9.

Calisher CH, Childs JE, Field HE, Holmes KV, Schountz T. Bats: important reservoir hosts of emerging viruses. *Clin Microbiol Rev.* 2006;19(3):531-45.

Campagna M, Eichwald C, Vascotto F, Burrone OR. RNA interference of rotavirus segment 11 mRNA reveals the essential role of NSP5 in the virus replicative cycle. *J Gen Virol.* 2005;86(Pt 5):1481-7.

Candeias JA, Rosenberg CP, Rácz ML. [Identification of rotavirus by counter-immunoelectrophoresis in cases of infantile diarrhea]. *Rev Saude Publica.* 1978;12(1):99-103.

Candy DC. Rotavirus infection: a systemic illness? *PLoS Med.* 2007;4(4):e117.

Carmona RC, Timenetsky Mdo C, da Silva FF, Granato CF. Characterization of rotavirus strains from hospitalized and outpatient children with acute diarrhoea in São Paulo, Brazil. *J Med Virol.* 2004;74(1):166-72.

Carmona RC, Timenetsky Mdo C, Morillo SG, Richtzenhain LJ. Human rotavirus serotype G9, São Paulo, Brazil, 1996-2003. *Emerg Infect Dis.* 2006;12(6):963-8.

Caruzo TA, Brito WM, Munford V, Rácz ML. Molecular characterization of G and P-types bovine rotavirus strains from Goiás, Brazil: high frequency of mixed P-type infections. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2010;105(8):1040-3.

Carvalho-Costa FA, Volotão Ede M, de Assis RM, Fialho AM, de Andrade Jda S, Rocha LN, Tort LF, da Silva MF, Gómez MM, de Souza PM, Leite JP. Laboratory-based rotavirus surveillance during the introduction of a vaccination program, Brazil, 2005-2009. *Pediatr Infect Dis J*. 2011;30(1 Suppl):S35-41.

Castello AA, Argüelles MH, Villegas GA, López N, Ghiringhelli DP, Semorile L, Glikmann G. Characterization of human group C rotavirus in Argentina. *J Med Virol*. 2000;62(2):199-207.

Castello AA, Argüelles MH, Villegas GA, Olthoff A, Glikmann G. Incidence and prevalence of human group C rotavirus infections in Argentina. *J Med Virol*. 2002;67(1):106-12.

Castello AA, Argüelles MH, Rota RP, Humphrey CD, Olthoff A, Gentsch JR, Glass RI, Glikmann G, Jiang B. Detection and characterization of group C rotavirus in Buenos Aires, Argentina, 1997-2003. *J Med Virol*. 2009a;81(6):1109-16.

Castello AA, Nakagomi T, Nakagomi O, Jiang B, Kang JO, Glass RI, Glikmann G, Gentsch JR. Characterization of genotype P[9]G12 rotavirus strains from Argentina: high similarity with Japanese and Korean G12 strains. *J Med Virol*. 2009b; 81(2):371-81.

Castrucci G, Frigeri F, Ferrari M, Cilli V, Aldrovandi V, Caleffi F, Gatti R. Comparative study of rotavirus strains of bovine and rabbit origin. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 1984;7(3-4):171-8.

Castrucci G, Frigeri F, Ferrari M, Cilli V, Aldrovandi V, Gatti R, Rampichini L. A comparison of rotavirus strains of bovine, simian and porcine origin. *Eur J Epidemiol*. 1985;1(4):274-80.

Caul EO, Ashley CR, Darville JM, Bridger JC. Group C rotavirus associated with fatal enteritis in a family outbreak. *J Med Virol*. 1990;30(3):201-5.

Cecilio AB, de Faria DB, Oliveira Pde C, Caldas S, de Oliveira DA, Sobral ME, Duarte MG, Moreira CP, Silva CG, de Almeida VL. Screening of Brazilian medicinal plants for antiviral activity against rotavirus. *J Ethnopharmacol.* 2012;141(3):975-81.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Progress in the introduction of rotavirus vaccine--Latin America and the Caribbean, 2006-2010. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2011;60(47):1611-4.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Rotavirus vaccine for the prevention of rotavirus gastroenteritis among children. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep.* 1999;48(RR-2):1-20.

Chan WK, Penaranda ME, Crawford SE, Estes MK. Two glycoproteins are produced from the rotavirus neutralization gene. *Virology.* 1986;151(2):243-52.

Chan-it W, Thongprachum A, Dey SK, Phan TG, Khamrin P, Okitsu S, Nishimura S, Kobayashi M, Kikuta H, Baba T, Yamamoto A, Sugita K, Hashira S, Tajima T, Ishida S, Mizuguchi M, Ushijima H. Detection and genetic characterization of rotavirus infections in non-hospitalized children with acute gastroenteritis in Japan, 2007-2009. *Infect Genet Evol.* 2011;11(2):415-22.

Chang KO, Nielsen PR, Ward LA, Saif LJ. Dual infection of gnotobiotic calves with bovine strains of group A and porcine-like group C rotaviruses influences pathogenesis of the group C rotavirus. *J Virol.* 1999;73(11):9284-93.

Chauhan RS, Singh NP. 1996. Epidemiology of rotavirus infection in calves in India. *Int J Anim Sci.* 1996;11:221-3.

Chege GK, Steele AD, Hart CA, Snodgrass DR, Omolo EO, Mwenda JM. Experimental infection of non-human primates with a human rotavirus isolate. *Vaccine.* 2005;23(12):1522-8.

Chemello ME, Aristimuño OC, Michelangeli F, Ruiz MC. Requirement for vacuolar H⁺ - ATPase activity and Ca²⁺ gradient during entry of rotavirus into MA104 cells. *J Virol.* 2002;76(24):13083-7.

Chen Z, Lambden PR, Lau J, Caul EO, Clarke IN. Human group C rotavirus: completion of the genome sequence and gene coding assignments of a non-cultivable rotavirus. *Virus Res.* 2002;83(1-2):179-87.

Chen D, Zeng CQ, Wentz MJ, Gorziglia M, Estes MK, Ramig RF. Template-dependent, in vitro replication of rotavirus RNA. *J Virol.* 1994;68(11):7030-9.

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987;162(1):156-9.

Ciarlet M, Estes M. Rotaviruses: basic biology, epidemiology and methodologies. In: Britton G, editor. *Encyclopedia of Environmental Microbiology.* John Wiley & Sons; New York. 2002. p. 2573-773.

Ciarlet M, Estes MK, Conner ME. Comparative amino acid sequence analysis of the outer capsid protein VP4 from four lapine rotavirus strains reveals identity with genotype P[14] human rotaviruses. *Arch Virol.* 1997a;142(5):1059-69.

Ciarlet M, Hoshino Y, Liprandi F. Single point mutations may affect the serotype reactivity of serotype G11 porcine rotavirus strains: a widening spectrum? *J Virol.* 1997b;71(11):8213-20.

Ciarlet M, Ludert JE, Liprandi F. Comparative amino acid sequence analysis of the major outer capsid protein (VP7) of porcine rotaviruses with G3 and G5 serotype specificities isolated in Venezuela and Argentina. *Arch Virol.* 1995;140(3):437-51.

Ciarlet M, Piña CI, García O, Liprandi F. Identification of bovine rotaviruses in Venezuela: antigenic and molecular characterization of a bovine rotavirus strain. *Res Virol.* 1997c;148(4):289-97.

Cilla G, Montes M, Gomariz M, Alkorta M, Iturzaeta A, Perez-Yarza EG, Perez-Trallero E. Rotavirus genotypes in children in the Basque Country (North of Spain): rapid and intense emergence of the G12[P8] genotype. *Epidemiol Infect.* 2013;141(4):868-74.

Cilli A, Luchs A, Morillo SG, Costa FF, Carmona Rde C, Timenetsky Mdo C. Characterization of rotavirus and norovirus strains: a 6-year study (2004-2009). *J Pediatr (Rio J).* 2011;87(5):445-9.

Clark KB, Lin SC, Humphrey C, Foytich K, Esona M, Wang Y, Liu M, Jiang B. Expression and characterization of human group C rotavirus virus-like particles in insect cells. *Virology*. 2009;387(2):267-72.

Clemens J, Rao M, Ahmed F, Ward R, Huda S, Chakraborty J, Yunus M, Khan MR, Ali M, Kay B. Breast-feeding and the risk of life-threatening rotavirus diarrhea: prevention or postponement? *Pediatrics*. 1993;92(5):680-5.

Cook N, Bridger J, Kendall K, Gomara MI, El-Attar L, Gray J. The zoonotic potential of rotavirus. *J Infect*. 2004;48(4):289-302.

Cook SJ, Lambden PR, Caul EO, Clarke IN. Molecular cloning, sequence analysis and coding assignment of the major inner capsid protein gene of human group C rotavirus. *Virology*. 1991; 184(2):781-5.

Cooney MA, Gorrell RJ, Palombo EA. Characterisation and phylogenetic analysis of the VP7 proteins of serotype G6 and G8 human rotaviruses. *J Med Microbiol*. 2001;50(5):462-7.

Collins PJ, Martella V, O'Shea H. Detection and characterization of group C rotaviruses in asymptomatic piglets in Ireland. *J Clin Microbiol*. 2008;46(9):2973-9.

Coluchi N, Munford V, Manzur J, Vazquez C, Escobar M, Weber E, Mármol P, Rácz ML. Detection, subgroup specificity, and genotype diversity of rotavirus strains in children with acute diarrhea in Paraguay. *J Clin Microbiol*. 2002;40(5):1709-14.

Coluchi-Mareco NB. Caracterização sorológica e molecular de rotavírus em crianças com diarreia aguda no Paraguai. Dissertação de Mestrado. ICB-USP. 2001.

Conner ME, Darlington RW. Rotavirus infection in foals. *Am J Vet Res*. 1980;41(10):1699-703.

Cooke SJ, Clarke IN, Freitas RB, Gabbay YB, Lambden PR. The correct sequence of the porcine group C/Cowden rotavirus major inner capsid protein shows close homology with human isolates from Brazil and the U.K. *Viol*. 1992; 190:531-537.

Coria-Galindo E, Rangel-Huerta E, Verdugo-Rodríguez A, Brousset D, Salazar S, Padilla-Noriega L. Rotavirus infections in Galapagos sea lions. *J Wildl Dis*.

2009;45(3):722-8.

Cortese MM, Parashar UD; Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Prevention of rotavirus gastroenteritis among infants and children: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep*. 2009;58(RR-2):1-25.

Coulson BS, Holmes IH. An improved enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of rotavirus in faeces of neonates. *J Virol Methods*. 1984;8(3):165-79.

Cox A, Guglielmetti P, Coulombier D. Assessing the impact of the 2009 H1N1 influenza pandemic on reporting of other threats through the Early Warning and Response System. *Euro Surveill*. 2009;14pii: 19397.

Cox MJ, James VLA, Azevedo RS, Massad E, Medley GF. Infection with group C rotavirus in a suburban community in Brazil. *Tropic Med Int Health*. 1998;3(2):891-5.

Crawford SE, Patel DG, Cheng E, Berkova Z, Hyser JM, Ciarlet M, Finegold MJ, Conner ME, Estes MK. Rotavirus viremia and extraintestinal viral infection in the neonatal rat model. *J Virol*. 2006;80(10):4820-32.

Cruickshank JG, Axton JH, Webster OF. Letter: Viruses in gastroenteritis. *Lancet*. 1974;1(7870):1353.

Cunliffe NA, Gondwe JS, Graham SM, Thindwa BD, Dove W, Broadhead RL, Molyneux ME, Hart CA. Rotavirus strain diversity in Blantyre, Malawi, from 1997 to 1999. *J Clin Microbiol*. 2001;39(3):836-43.

Curns AT, Panozzo CA, Tate JE, Payne DC, Patel MM, Cortese MM, Parashar UD. Remarkable postvaccination spatiotemporal changes in United States rotavirus activity. *Pediatr Infect Dis J*. 2011;30(1 Suppl):S54-5.

da Silva MF, Tort LF, Gómez MM, Assis RM, Volotão Ede M, de Mendonça MC, Bello G, Leite JP. VP7 Gene of human rotavirus A genotype G5: Phylogenetic analysis reveals the existence of three different lineages worldwide. *J Med Virol*. 2011;83(2):357-66.

Davidson GP, Barnes GL. Structural and functional abnormalities of the small intestine in infants and young children with rotavirus enteritis. *Acta Paediatr Scand.* 1979;68(2):181-6.

Davidson GP, Bishop RF, Townley RR, Holmes IH. Importance of a new virus in acute sporadic enteritis in children. *Lancet.* 1975;1(7901):242-6.

de Castro L, Rodrigues Ddos P, Flauzino R, Moura M, Leite JP. An outbreak of diarrhoea associated with rotavirus serotype 1 in a day care nursery in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1994;89(1):5-9.

De Grazia S, Martella V, Giammanco GM, Gómara MI, Ramirez S, Cascio A, Colomba C, Arista S. Canine-origin G3P[3] rotavirus strain in child with acute gastroenteritis. *Emerg Infect Dis.* 2007;13(7):1091-3.

Dennehy PH. Rotavirus vaccines: an overview. *Clin Microbiol Rev.* 2008;21(1):198-208.

Desai R, Curns AT, Steiner CA, Tate JE, Patel MM, Parashar UD. All-cause gastroenteritis and rotavirus-coded hospitalizations among US children, 2000-2009. *Clin Infect Dis.* 2012;55(4):e28-34.

Desai SN, Vázquez M. Update on rotavirus trends and the importance of surveillance. *Pediatr Infect Dis J.* 2010;29(12):1130-2.

Desselberger U. Rotavirus infections: guidelines for treatment and prevention. *Drugs.* 1999;58(3):447-52.

Desselberger U, Iturriza-Gómara M, Gray JJ. Rotavirus epidemiology and surveillance. *Novartis Found Symp.* 2001;238:125-47; discussion 147-52.

Desselberger U, McCrae MA. The rotavirus genome. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1994;185:31-66.

Desselberger U, Wolleswinkel-van den Bosch J, Mrukowicz J, Rodrigo C, Giaquino C, Vesikari T. Rotavirus types in Europe and their significance for vaccination. *Pediatr Infect Dis J*. 2006;25:S30-41.

Dhama K, Chauhan RS, Mahendran M, Malik SV. Rotavirus diarrhea in bovines and other domestic animals. *Vet Res Commun*. 2009;33(1):1-23.

Dhama K, Mahendran M, Gupta PK, Rai A. DNA vaccines and their applications in veterinary practice: current perspectives. *Vet Res Commun*. 2008;32(5):341-56.

do Carmo GM, Yen C, Cortes J, Siqueira AA, de Oliveira WK, Cortez-Escalante JJ, Lopman B, Flannery B, de Oliveira LH, Carmo EH, Patel M. Decline in diarrhea mortality and admissions after routine childhood rotavirus immunization in Brazil: a time-series analysis. *PLoS Med*. 2011;8(4):e1001024.

Dodet B, Heseltine E, Mary C, Saliou P. Rotaviruses in human and veterinary medicine. *Sante*. 1997;7(3):195-9.

Dormitzer PR, Nason EB, Prasad BV, Harrison SC. Structural rearrangements in the membrane penetration protein of a non-enveloped virus. *Nature*. 2004;430(7003):1053-8.

Dulgheroff AC, Figueiredo EF, Moreira LP, Moreira KC, Moura LM, Gouvêa VS, Domingues AL. Distribution of rotavirus genotypes after vaccine introduction in the Triângulo Mineiro region of Brazil: 4-Year follow-up study. *J Clin Virol*. 2012;55(1):67-71.

Dunn SJ, Burns JW, Cross TL, Vo PT, Ward RL, Bremont M, Greenberg HB. Comparison of VP4 and VP7 of five murine rotavirus strains. *Virology*. 1994;203(2):250-9.

Dyall-Smith ML, Lazdins I, Tregear GW, Holmes IH. Location of the major antigenic sites involved in rotavirus serotype-specific neutralization. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1986;83(10):3465-8.

Elschner M, Hotzel H, Reetz J, Diller R, Otto P. Isolation, identification and characterization of group A rotavirus from a chicken: the inner capsid protein sequence shows only a distant phylogenetic relationship to most other avian group A rotaviruses.

J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health. 2005a;52(5):211-3.

Elschner M, Schrader C, Hotzel H, Prudlo J, Sachse K, Eichhorn W, Herbst W, Otto P. Isolation and molecular characterisation of equine rotaviruses from Germany. *Vet Microbiol.* 2005b;105(2):123-9.

Esona MD, Banyai K, Foytich K, Freeman M, Mijatovic-Rustempasic S, Hull J, Kerin T, Steele AD, Armah GE, Geyer A, Page N, Agbaya VA, Forbi JC, Aminu M, Gautam R, Seheri LM, Nyangao J, Glass R, Bowen MD, Gentsch JR. Genomic characterization of human rotavirus G10 strains from the African Rotavirus Network: relationship to animal rotaviruses. *Infect Genet Evol.* 2011;11(1):237-41.

Esona MD, Geyer A, Page N, Trabelsi A, Fodha I, Aminu M, Agbaya VA, Tsion B, Kerin TK, Armah GE, Steele AD, Glass RI, Gentsch JR. Genomic characterization of human rotavirus G8 strains from the African rotavirus network: relationship to animal rotaviruses. *J Med Virol.* 2009;81(5):937-51.

Esona MD, McDonald S, Kamili S, Kerin T, Gautam R, Bowen MD. Comparative evaluation of commercially available manual and automated nucleic acid extraction methods for rotavirus RNA detection in stools. *J Virol Methods.* 2013;194:242-249.

Esona MD, Mijatovic-Rustempasic S, Conrardy C, Tong S, Kuzmin IV, Agwanda B, Breiman RF, Banyai K, Niezgodna M, Rupprecht CE, Gentsch JR, Bowen MD. Reassortant group A rotavirus from straw-colored fruit bat (*Eidolon helvum*). *Emerg Infect Dis.* 2010a;16(12):1844-52.

Esona MD, Page NA, Akran VA, Armah GE, Steele AD. Characterization of 2 human genotype G10 rotavirus strains, 3008CM and 1784/CI/1999, isolated in Cameroon and Cote d'Ivoire during the 1999-2000 rotavirus season. *J Infect Dis.* 2010b;202 Suppl:S212-9.

Esona MD, Steele D, Kerin T, Armah G, Peenze I, Geyer A, Page N, Nyangao J, Agbaya VA, Trabelsi A, Tsion B, Aminu M, Sebunya T, Dewar J, Glass R, Gentsch J. Determination of the G and P types of previously nontypeable rotavirus strains from the African Rotavirus Network, 1996-2004: Identification of unusual G types. *J Infect Dis.* 2010c;202 Suppl:S49-54.

Esteban LE, Rota RP, Gentsch JR, Jiang B, Esona M, Glass RI, et al. Molecular epidemiology of group A rotavirus in Buenos Aires, Argentina 2004–2007: reemergence of G2P[4] and emergence of G9P[8] strains. *J Med Virol* 2010;82(6):1083–93.

Estes MK. Rotavirus and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE (Eds), *Fields Virology*, 4th ed. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, 2001. p. 1747-85.

Estes MK, Cohen J. Rotavirus gene structure and function. *Microbiol Rev.* 1989;53(4):410-49.

Estes M, Kapikian A. Rotaviruses. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE (Eds), *Fields Virology*, 5th ed. Kluwer Health/Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, 2007. p. 1917-74.

Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA. *Virus taxonomy. Eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.*, San Diego, CA: Academic Press, 2007. p. 447-96.

Fenaux M, Cuadras MA, Feng N, Jaimes M, Greenberg HB. Extraintestinal spread and replication of a homologous EC rotavirus strain and a heterologous rhesus rotavirus in BALB/c mice. *J Virol.* 2006;80(11):5219-32.

Fernelius AL, Ritchie AE, Classick LG, Norman JO, Mebus CA. Cell culture adaptation and propagation of a reovirus-like agent of calf diarrhea from a field outbreak in Nebraska. *Arch Gesamte Virusforsch.* 1972;37(1):114-30.

Ferrera A, Quan D, Espinoza F. Increased prevalence of genotype G2P(4) among children with rotavirus-associated gastroenteritis in Honduras. 17th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases ICC; 2007 Mar 31-Apr 04; Munich. Hoboken (NJ): Wiley-Blackwell; 2007.

Ferreira MS, Xavier Mda P, Tinga AC, Rose TL, Fumian TM, Fialho AM, de Assis RM, Carvalho Costa FA, de Oliveira SA, Leite JP, Miagostovich MP. Assessment of gastroenteric viruses frequency in a children's day care center in Rio De Janeiro, Brazil: a fifteen year study (1994-2008). *PLoS One.* 2012;7(3):e33754.

Fielding PA, Lambden PR, Caul EO, Clarke IN. Molecular characterization of the outer capsid spike protein (VP4) gene from human group C rotavirus. *Virology*. 1994;204(1):442-6.

Finamore E, Vitiello M, Kampanaraki A, Rao M, Galdiero M, Galdiero E, Bevilacqua P, Gallo MA, Galdiero M. G2 as an emerging rotavirus strain in pediatric gastroenteritis in southern Italy. *Infection*. 2011;39(2):113-9.

Fischer TK, Page NA, Griffin DD, Eugen-Olsen J, Pedersen AG, Valentiner-Branth P, Mølbak K, Sommerfelt H, Nielsen NM. Characterization of incompletely typed rotavirus strains from Guinea-Bissau: identification of G8 and G9 types and a high frequency of mixed infections. *Virology*. 2003;311(1):125-33.

Fischer TK, Valentiner-Branth P, Steinsland H, Perch M, Santos G, Aaby P, Mølbak K, Sommerfelt H. Protective immunity after natural rotavirus infection: a community cohort study of newborn children in Guinea-Bissau, west Africa. *J Infect Dis*. 2002;186(5):593-7.

Fischer TK, Steinsland H, Mølbak K, Ca R, Gentsch JR, Valentiner-Branth P, Aaby P, Sommerfelt H. Genotype profiles of rotavirus strains from children in a suburban community in Guinea-Bissau, Western Africa. *J Clin Microbiol*. 2000;38(1):264-7.

Fischer Walker CL, Perin J, Aryee MJ, Boschi-Pinto C, Black RE. Diarrhea incidence in low- and middle-income countries in 1990 and 2010: a systematic review. *BMC Public Health*. 2012;12:220.

Flewett TH, Bryden AS, Davies H, Woode GN, Bridger JC, Derrick JM. Relation between viruses from acute gastroenteritis of children and newborn calves. *Lancet*. 1974;2(7872):61-3.

Flewett TH, Davies H, Bryden AS, Robertson MJ. Diagnostic electron microscopy of faeces. II. Acute gastroenteritis associated with reovirus-like particles. *J Clin Pathol*. 1974b;27(8):608-14.

Fujii R, Kuzuya M, Hamano M, Yamada M, Yamazaki S. Detection of human group C rotaviruses by an enzyme-linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol*. 1992;30(5):1307-11.

Fukai K, Maeda Y, Fujimoto K, Itou T, Sakai T. Changes in the prevalence of rotavirus G and P types in diarrheic calves from the Kagoshima prefecture in Japan. *Vet Microbiol.* 2002;86(4):343-9.

Fukai K, Onoda H, Itou T, Sato M, Miura Y, Sakai T. Genetic and serological characterization of novel serotype G8 bovine group A rotavirus strains isolated in Japan. *J Vet Med Sci.* 2004;66(11):1413-6.

Fukai K, Sakai T, Hirose M, Itou T. Prevalence of calf diarrhea caused by bovine group A rotavirus carrying G serotype 8 specificity. *Vet Microbiol.* 1999;66(4):301-11.

Fukai K, Saito T, Fukuda O, Hagiwara A, Inoue K, Sato M. Molecular characterisation of equine group A rotavirus, Nasuno, isolated in Tochigi Prefecture, Japan. *Vet J.* 2006;172(2):369-73.

Gabbay YB, Borges AA, Oliveira DS, Linhares AC, Mascarenhas JDP, Barardi CRM, Simoes CMO, Wang Y, Glass RI, Jiang B. Evidence for zoonotic transmission of group C rotavirus among children in Belem, Brazil. *J Med Virol.* 2008;80(9):1666-74.

Gabbay YB, Jiang B, Oliveira CS, Mascarenhas JD, Leite JP, Glass RI, Linhares AC. An outbreak of grupo C rotavirus gastroenteritis among children attending a day-care centre in Belém, Brazil. *J Diarrhoeal Dis Res.* 1999;17(2):69-74.

Gabbay YB, Mascarenhas JDP, Linhares AC, Freitas RB. Atypical rotavirus among children living in Belém, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1989;84(1):5-8.

Gazal S, Taku AK, Kumar B. Predominance of rotavirus genotype G6P[11] in diarrhoeic lambs. *Vet J.* 2012;193(1):299-300.

Gentsch JR, Laird AR, Bielfelt B, Griffin DD, Banyai K, Ramachandran M, Jain V, Cunliffe NA, Nakagomi O, Kirkwood CD, Fischer TK, Parashar UD, Bresee JS, Jiang B, Glass RI. Serotype diversity and reassortment between human and animal rotavirus strains: implications for rotavirus vaccine programs. *J Infect Dis.* 2005;192 Suppl 1:S146-59.

Gentsch JR, Glass RI, Woods P, Gouvea V, Gorziglia M, Flores J, Das BK, Bhan MK.

Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1992;30(6):1365-73.

Gerna G, Sears J, Hoshino Y, Steele AD, Nakagomi O, Sarasini A, Flores J. Identification of a new VP4 serotype of human rotaviruses. *Virology.* 1994;200(1):66-71.

Ghosh S, Alam MM, Ahmed MU, Talukdar RI, Paul SK, Kobayashi N. Complete genome constellation of a caprine group A rotavirus strain reveals common evolution with ruminant and human rotavirus strains. *J Gen Virol.* 2010;91(Pt 9):2367-73.

Ghosh S, Gatheru Z, Nyangao J, Adachi N, Urushibara N, Kobayashi N. Full genomic analysis of a G8P[1] rotavirus strain isolated from an asymptomatic infant in Kenya provides evidence for an artiodactyl-to-human interspecies transmission event. *J Med Virol.* 2011;83(2):367-76.

Ghosh S, Varghese V, Samajdar S, Sinha M, Kobayashi N, Naik TN. Molecular characterization of bovine group A rotavirus G3P[3] strains. *Arch Virol.* 2007a;152(10):1935-40.

Ghosh S, Varghese V, Samajdar S, Bhattacharya SK, Kobayashi N, Naik TN. Evidence for independent segregation of the VP6- and NSP4-encoding genes in porcine group A rotavirus G6P[13] strains. *Arch Virol.* 2007b;152(10):1935-40.

Gill H, Prasad J. Probiotics, immunomodulation, and health benefits. *Adv Exp Med Biol.* 2008;606:423-54.

Gladstone BP, Ramani S, Mukhopadhyaya I, Muliylil J, Sarkar R, Rehman AM, Jaffar S, Gomara MI, Gray JJ, Brown DW, Desselberger U, Crawford SE, John J, Babji S, Estes MK, Kang G. Protective effect of natural rotavirus infection in an Indian birth cohort. *N Engl J Med.* 2011;365(4):337-46.

Gómez J, Estes MK, Matson DO, Bellinzoni R, Alvarez A, Grinstein S. Serotyping of human rotaviruses in Argentina by ELISA with monoclonal antibodies. *Arch Virol.* 1990;112(3-4):249-59.

Gómez MM, Volotão EM, de Mendonça MC, Tort LF, da Silva MF, Leite JP. Detection

of uncommon rotavirus A strains P[8]G8 and P[4]G8 in the city of Rio de Janeiro, 2002. *J Med Virol.* 2010;82(7):1272-6.

Gouvea V, Allen JR, Glass RI, Fang ZY, Bermont M, Cohen J, McCrea MA, Saif LJ, Sinarachatanant P, Caul EO. Detection of group B and C rotaviruses by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1991;29(3):519-23.

Gouvea V, de Castro L, Timenetsky MC, Greenberg H, Santos N. Rotavirus serotype G5 associated with diarrhea in Brazilian children. *J Clin Microbiol.* 1994;32(5):1408-9. Erratum in: *J Clin Microbiol.* 1994a;32(7):1834.

Gouvea VS, Dias GS, Aguiar EA, Pedro AR, Fichman ER, Chinem ES, Gomes SP, Domingues AL. Acute gastroenteritis in a pediatric hospital in rio de janeiro in pre- and post-rotavirus vaccination settings. *Open Virol J* 2009;3:26-30.

Gouvea VS, Domingues AL, Naveca FG, Pedro AR, Bevilacqua CC. Changing epidemiology of rotavirus-related hospitalizations in rio de janeiro, Brazil, from 2002 to 2006. *Open Virol J.* 2007;1:47-50.

Gouvea V, Glass RI, Woods P, Taniguchi K, Clark HF, Forrester B, Fang ZY. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *J Clin Microbiol.* 1990;28(2):276-82.

Gouvea V, Santos N, Timenetsky Mdo C. VP4 typing of bovine and porcine group A rotaviruses by PCR. *J Clin Microbiol.* 1994b;32(5):1333-7.

Gouvea V, Santos N, Timenetsky Mdo C. Identification of bovine and porcine rotavirus G types by PCR. *J Clin Microbiol.* 1994c;32(5):1338-40.

Gorziglia M, Green K, Nishikawa K, Taniguchi K, Jones R, Kapikian AZ, Chanock RM. Sequence of the fourth gene of human rotaviruses recovered from asymptomatic or symptomatic infections. *J Virol.* 1988;62(8):2978-84.

Gorziglia M, Larralde G, Kapikian AZ, Chanock RM. Antigenic relationships among human rotaviruses as determined by outer capsid protein VP4. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87(18):7155-9.

Graham DY, Estes MK. Proteolytic enhancement of rotavirus infectivity: biology mechanism. *Virology*. 1980;101(2):432-9.

Grant L, Esona M, Gentsch J, Watt J, Reid R, Weatherholtz R, Santosham M, Parashar U, O'Brien K. Detection of G3P[3] and G3P[9] rotavirus strains in American Indian children with evidence of gene reassortment between human and animal rotaviruses. *J Med Virol*. 2011;83(7):1288-99.

Green KY, Midthun K, Gorziglia M, Hoshino Y, Kapikian AZ, Chanock RM, Flores J. Comparison of the amino acid sequences of the major neutralization protein of four human rotavirus serotypes. *Virology*. 1987;161(1):153-9.

Greenberg HB, Estes MK. Rotaviruses: from pathogenesis to vaccination. *Gastroenterology*. 2009;136(6):1939-51.

Grice AS, Lambden PR, Caul EO, Clarke IN. Sequence conservation of the major outer capsid glycoprotein of human group C rotaviruses. *J Med Virol*. 1994;44(2):166-71.

Guerrero CA, Moreno LP. Rotavirus receptor proteins Hsc70 and integrin $\alpha\beta 3$ are located in the lipid microdomains of animal intestinal cells. *Acta Virol*. 2012;56(1):63-70.

Gulati BR, Deepa R, Singh BK, Rao CD. Diversity in Indian equine rotaviruses: identification of genotype G10,P6[1] and G1 strains and a new VP7 genotype (G16) strain in specimens from diarrheic foals in India. *J Clin Microbiol*. 2007;45(7):2354.

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

Gurgel RQ, Correia JB, Cuevas LE. Effect of rotavirus vaccination on circulating virus strains. *Lancet*. 2008;371(9609):301-2.

Hagbom M, Sharma S, Lundgren O, Svensson L. Towards a human rotavirus disease model. *Curr Opin Virol*. 2012;2(4):408-18.

Halaihel N, Masía RM, Fernández-Jiménez M, Ribes JM, Montava R, De Blas I,

Gironés O, Alonso JL, Buesa J. Enteric calicivirus and rotavirus infections in domestic pigs. *Epidemiol Infect.* 2010;138(4):542-8.

He B, Yang F, Yang W, Zhang Y, Feng Y, Zhou J, Xie J, Feng Y, Bao X, Gou H, Li Y, Xia L, Li N, Matthijnssens J, Zhang H, Tu C. Characterization of a novel G3P[3] rotavirus isolated from a lesser horseshoe bat: a distant relative of feline/canine rotavirus. *J Virol.* 2013;87(22):12357-66.

Heaton PM, Ciarlet M. Vaccines: the pentavalent rotavirus vaccine: discovery to licensure and beyond. *Clin Infect Dis.* 2007;45(12):1618-24.

Herring AJ, Inglis NF, Ojeh CK, Snodgrass DR, Menzies JD. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. *J Clin Microbiol.* 1982;16(3):473-7.

Holland RE. Some infectious causes of diarrhea in young farm animals. *Clin Microbiol Rev.* 1990;3(4):345-75.

Holmes IH, Mathan M, Bhat P, Albert MJ, Swaminathan SP, Maiya PP, Pereira SM, Baker SJ. Letter: Orbiviruses and gastroenteritis. *Lancet.* 1974;2(7881):658-9.

Holmes IH, Ruck BJ, Bishop RF, Davidson GP. Infantile enteritis viruses: morphogenesis and morphology. *J Virology.* 1975;16:937-43.

Honma S, Chizhikov V, Santos N, Tatsumi M, Timenetsky Mdo C, Linhares AC, Mascarenhas JD, Ushijima H, Armah GE, Gentsch JR, Hoshino Y. Development and Validation of DNA Microarray for Genotyping Group A Rotavirus VP4 (P[4], P[6], P[8], P[9], and P[14]) and VP7 (G1 to G6, G8 to G10, and G12) Genes. *J Clin Microbiol.* 2007;45(8):2641-8.

Horie Y, Nakagomi T, Oseto M, Masamune O, Nakagomi O. Conserved structural features of nonstructural glycoprotein NSP4 between group A and group C rotaviruses. *Arch Virol.* 1997;142: 1865-1872.

Hoshino Y, Jones RW, Ross J, Honma S, Santos N, Gentsch JR, Kapikian AZ. Rotavirus serotype G9 strains belonging to VP7 gene phylogenetic sequence lineage 1

may be more suitable for serotype G9 vaccine candidates than those belonging to lineage 2 or 3. *J Virol.* 2004;78(14):7795-802.

Hoshino Y, Kapikian AZ. Rotavirus antigens. In: *Rotaviruses*. Ed. RF Ramig. Berlin, Springer – Verlag, 1994. p. 180-227.

Hoshino Y, Saif LJ, Sereno MM, Chanock RM, Kapikian AZ. Infection immunity of piglets to either VP3 or VP7 outer capsid protein confers resistance to challenge with a virulent rotavirus bearing the corresponding antigen. *J Virol.* 1988;62(3):744-8.

Huang H, Schroeder F, Zeng C, Estes MK, Schoer JK, Ball JM. Membrane interactions of a novel viral enterotoxin: rotavirus nonstructural glycoprotein NSP4. *Biochemistry.* 2001;40(13):4169-80.

Hughes AL, Yeager M. Coordinated amino acid changes in the evolution of mammalian defensins. *J Mol Evol.* 1997;44(6):675-82.

Imai M, Akatani K, Ikegami N, Furuichi Y. Capped and conserved terminal structures in human rotavirus genome double-stranded RNA segments. *J Virol.* 1983;47(1):125-36.

Ito H, Sugiyama M, Masubuchi K, Mori Y, Minamoto N. Complete nucleotide sequence of a group A avian rotavirus genome and a comparison with its counterparts of mammalian rotaviruses. *Virus Res.* 2001;75(2):123-38.

Iturriza-Gómara M, Clarke I, Desselberger U, Brown D, Thomas D, Gray J. Seroepidemiology of group C rotavirus infection in England and Wales. *Eur J Epidemiol.* 2004a;19(6):589-95.

Iturriza-Gómara M, Dallman T, Bányai K, Böttiger B, Buesa J, Diedrich S et al. Rotavirus genotypes co-circulating in Europe between 2006 and 2009 as determined by EuroRotaNet, a pan-European collaborative strain surveillance network. *Epidemiol Infect.* 2011;139:895-909.

Iturriza-Gómara M, Green J, Brown DWG, Desselberger U, Gray JJ. Diversity within the VP4 gene of rotavirus P[8] strains: implications for reverse transcription-PCR genotyping. *J Clin Microbiol* 2000; 38:898–901.

Iturriza-Gómara M, Isherwood B, Desselberger U, Gray J. Reassortment in vivo: driving force for diversity of human rotavirus strains isolated in the United Kingdom between 1995 and 1999. *J Virol.* 2001;75(8):3696-705.

Iturriza-Gómara M, Kang G, Mammen A, Jana AK, Abraham M, Desselberger U, Brown D, Gray J. Characterization of G10P[11] rotaviruses causing acute gastroenteritis in neonates and infants in Vellore, India. *J Clin Microbiol.* 2004b;42(6):2541-7.

Iturriza-Gómara M, Wong C, Blome S, Desselberger U, Gray J. Molecular characterization of VP6 genes of human rotavirus isolates: correlation of genogroups with subgroups and evidence of independent segregation. *J Virol.* 2002;76(13):6596-601.

Jagannath MR, Vethanayagam RR, Reddy BS, Raman S, Rao CD. Characterization of human symptomatic rotavirus isolates MP409 and MP480 having 'long' RNA electropherotype and subgroup I specificity, highly related to the P6[1],G8 type bovine rotavirus A5, from Mysore, India. *Arch Virol.* 2000;145(7):1339-57.

James VL, Lambden PR, Caul EO, Cooke SJ, Clarke IN. Seroepidemiology of human group C rotavirus in the UK. *J Med Virol.* 1997;52(1):86-91.

Jeong YJ, Park SI, Hosmillo M, Shin DJ, Chun YH, Kim HJ, Kwon HJ, Kang SY, Woo SK, Park SJ, Kim GY, Kang MI, Cho KO. Detection and molecular characterization of porcine group C rotaviruses in South Korea. *Vet Microbiol.* 2009;138(3-4):217-24.

Jere KC, Mlera L, O'Neill HG, Peenze I, van Dijk AA. Whole genome sequence analyses of three African bovine rotaviruses reveal that they emerged through multiple reassortment events between rotaviruses from different mammalian species. *Vet Microbiol.* 2012;159(1-2):245-50.

Jiang B, Dennehy PH, Spangenberg S, Gentsch JR, Glass RI. First detection of group C rotavirus in fecal specimens of children with diarrhea in the United States. *J Infect Dis.* 1995;172(1):45-50.

Jiang B, Gentsch JR, Glass RI. The role of serum antibodies in the protection against rotavirus disease: an overview. *Clin Infect Dis.* 2002;34(10):1351-61.

Jiang B, Gentsch JR, Tsunemitsu H, Saif LJ, Glass RI. Sequence analysis of the gene encoding VP4 of a bovine group C rotavirus: molecular evidence for a new P genotype. *Virus Genes*. 1999;19(1):85-88.

Jiang S, Ji S, Tang Q, Cui X, Yang H, Kan B, Gao S. Molecular characterization of a novel adult diarrhoea rotavirus strain J19 isolated in China and its significance for the evolution and origin of group B rotaviruses. *J Gen Virol*. 2008;89(Pt 10):2622-9.

Jiang B, Tsunemitsu PH, Dennehy I, Oishi D, Brown RD, Schnagl RD, Oseto M, Fang ZY, Avendano LF, Saif LJ, Glass RI. Sequence conservation and expression of the gene encoding the outer capsid glycoprotein among human group C rotaviruses of global distribution. *Arch Virol*. 1996;141(2):381-90.

Jiang B, Tsunemitsu H, Gentsch JR, Glas RI, Green KY, Qian Y, Saif L. Nucleotide sequence of gene 5 encoding the inner capsid protein (VP6) of bovine group C rotavirus: comparison with corresponding genes of group C, A, and B rotaviruses. *Viol*. 1992; 190:542-547.

Jin Q, Ward RL, Knowlton DR, Gabbay YB, Linhares AC, Rappaport R, Woods PA, Glass RI, Gentsch JR. Divergence of VP7 genes of G1 rotaviruses isolated from infants vaccinated with reassortant rhesus rotaviruses. *Arch Virol*. 1996;141(11):2057-76.

Johne R, Otto P, Roth B, Löhren U, Belnap D, Reetz J, Trojnar E. Sequence analysis of the VP6-encoding genome segment of avian group F and G rotaviruses. *Virology*. 2011;412(2):384-91.

Kang G. Rotavirus vaccines. *Indian J Med Microbiol*. 2006;24(4):252-7.

Kang BK, Song DS, Jung KI, Lee CS, Park SJ, Oh JS, An DJ, Yang JS, Moon HJ, Lee SS, Yoon YD, Park BK. Genetic characterization of canine rotavirus isolated from a puppy in Korea and experimental reproduction of disease. *J Vet Diagn Invest*. 2007; 19(1):78-83.

Kapikian AZ, Chanock RM. Rotaviruses. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM (Eds), *Fields Virology*, 3rd ed, vol 2. Lippincott-Raven Press, Philadelphia, PA. 1996. p. 1657-708.

Kapikian AZ, Hoshino Y, Chanock RM. Rotaviruses. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Martin MA, Lamb RA, Roizman B, Strauss SE (Eds), *Fields Virology*, 4th ed, vol 2. Lippincott-Raven Press, Philadelphia, PA. 2001. p. 1787-833.

Kapikian AZ, Kim HW, Wyatt RG, Rodriguez WJ, Ross S, Cline WL, Parrott RH, Chanock RM. Reoviruslike agent in stools: association with infantile diarrhea and development of serologic tests. *Science*. 1974;185(4156):1049-53.

Kapikian AZ, Wyatt RG, Levine MM, Yolken RH, VanKirk DH, Dolin R, Greenberg HB, Chanock RM. Oral administration of human rotavirus to volunteers: induction of illness and correlates of resistance. *J Infect Dis*. 1983;147(1):95-106.

Khamrin P, Maneekarn N, Peerakome S, Yagyu F, Okitsu S, Ushijima H. Molecular characterization of a rare G3P[3] human rotavirus reassortant strain reveals evidence for multiple human-animal interspecies transmissions. *J Med Virol*. 2006;78(7):986-94.

Khamrin P, Peerakome S, Malasao R, Mizuguchi M, Okitsu S, Ushijima H, Maneekarn N. Genetic characterization of group C rotavirus isolated from a child hospitalized with acute gastroenteritis in Chiang Mai, Thailand. *Virus Genes*. 2008;37(3):314-21.

Kim Y, Chang KO, Straw B, Saif LJ. Characterization of group C rotaviruses associated with diarrhea outbreaks in feeder pigs. *J Clin Microbiol*. 1999;37(5):1484-8.

Kim Y, George D, Prior AM, Prasain K, Hao S, Le DD, Hua DH, Chang KO. Novel triacsin C analogs as potential antivirals against rotavirus infections. *Eur J Med Chem*. 2012;50:311-8.

Kindler E, Trojnar E, Heckel G, Otto PH, Johne R. Analysis of rotavirus species diversity and evolution including the newly determined full-length genome sequences of rotavirus F and G. *Infect Genet Evol*. 2012;14C:58-67.

Kirkwood CD, Boniface K, Bishop RF, Barnes GL; Australian Rotavirus Surveillance Group. Australian Rotavirus Surveillance Program annual report, 2008/2009. *Commun Dis Intell Q Rep*. 2009;33(4):382-8.

Kirkwood CD, Boniface K, Bishop RF, Barnes GL. Australian Rotavirus Surveillance

Program: annual report, 2009/2010. *Commun Dis Intell Q Rep.* 2010;34(4):427-34.

Kirkwood CD, Bishop RF, Coulson BS. Human rotavirus VP4 contains strain-specific, serotype-specific and cross-reactive neutralization sites. *Arch Virol.* 1996;141(3-4):587-600.

Kirkwood CD, Cannan D, Boniface K, Bishop RF, Barnes GL; Australian Rotavirus Surveillance Group. Australian Rotavirus Surveillance Program annual report, 2007/08. *Commun Dis Intell Q Rep.* 2008;32(4):425-9.

Kirkwood CD, Roczo S, Boniface K, Bishop RF, Barnes GL; Australian Rotavirus Surveillance Group. Australian Rotavirus Surveillance Program annual report, 2010/11. *Commun Dis Intell Q Rep.* 2011;35(4):281-7.

Koroglu M, Yakupogullari Y, Otlu B, Ozturk S, Ozden M, Ozer A, Sener K, Durmaz R. A waterborne outbreak of epidemic diarrhea due to group A rotavirus in Malatya, Turkey. *New Microbiol.* 2011;34(1):17-24.

Kumazaki M, Usuku S. Epidemiological and genetic analysis of human group C rotaviruses isolated from outbreaks of acute gastroenteritis in Yokohama, Japan, between 2006 and 2012. *Arch Virol.* Oct 25. [Epub ahead of print]

Kuzuya M, Fujii R, Hamano M, Nakamura J, Yamada M, Nii S, Mori T. Molecular analysis of outer capsid glycoprotein (VP7) genes from two isolates of human group C rotavirus with different genome electropherotypes. *J Clin Microbiol.* 1996;34(12):3185-9.

Kuzuya M, Fujii R, Hamano M, Ohata R, Ogura H, Yamada M. Seroepidemiology of human group C rotavirus in Japan based on a blocking enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2001;8(1):161-5.

Kuzuya M, Fujii R, Hamano M, Nishijima M, Ogura H. Detection and molecular characterization of human group C rotaviruses in Okayama prefecture, Japan, between 1986 and 2005. *J Med Virol.* 2007;79(8):1219-28.

Kuzuya M, Fujii R, Hamano M, Ogura H. [Outbreak of acute gastroenteritis caused by human group C rotavirus in a youth educational center in Okayama Prefecture].

Kansenshogaku Zasshi. 2003;77(2):53-9. Japanese.

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. *J Clin Microbiol.* 1998;36(1):6-10.

Laird AR, Gentsch JR, Nakagomi T, Nakagomi O, Glass RI. Characterization of serotype G9 rotavirus strains isolated in the United States and India from 1993 to 2001. *J Clin Microbiol.* 2003;41(7):3100-11.

Lamberti LM, Fischer Walker CL, Noiman A, Victora C, Black RE. Breastfeeding and the risk for diarrhea morbidity and mortality. *BMC Public Health.* 2011;11(Suppl 3):S15

Lanzieri TM, Linhares AC, Costa I, Kolhe DA, Cunha MH, Ortega-Barria E, Colindres RE. Impact of rotavirus vaccination on childhood deaths from diarrhea in Brazil. *Int J Infect Dis.* 2011;15(3):e206-10.

Lawton JA, Estes MK, Prasad BV. Mechanism of genome transcription in segmented dsRNA viruses. *Adv Virus Res.* 2000;55:185-229.

Lee JB, Youn SJ, Nakagomi T, Park SY, Kim TJ, Song CS, Jang HK, Kim BS, Nakagomi O. Isolation, serologic and molecular characterization of the first G3 caprine rotavirus. *Arch Virol.* 2003;148(4):643-57.

Lee SG, Youn SH, Oh MH, Rhee OJ, Oh S, Paik SY. Molecular characterization of two strains of porcine group C rotavirus. *J Microbiol.* 2011;49(6):1058-62.

Legrottaglie R, Rizzi V, Agrimi P. Isolation and identification of avian rotavirus from pheasant chicks with signs of clinical enteritis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 1997;20(3):205-10.

Leite JP, Alfieri AA, Woods PA, Glass RI, Gentsch JR. Rotavirus G and P types circulating in Brazil: characterization by RT-PCR, probe hybridization, and sequence analysis. *Arch Virol.* 1996;141(12):2365-74.

Leite JRT. A China no Brasil: influências, marcas, ecos e sobrevivências chinesas na

sociedade e na arte brasileiras. Campinas: Ed. da Unicamp, 1999.

Lesser JR. A negociação da identidade nacional: imigrantes, minorias e a luta pela etnicidade no Brasil. Cap.2, A mão-de-obra chinesa e o debate sobre a integração étnica. São Paulo, Editora UNESP, 2001.

Leung AK, Kellner JD, Davies HD. Rotavirus gastroenteritis. *Adv Ther.* 2005;22(5):476-87.

Li B, Clark HF, Gouvea V. Nucleotide sequence of the VP4-encoding gene of an unusual human rotavirus (HCR3). *Virology.* 1993;196(2):825-30.

Libersou S, Siebert X, Ouldali M, Estrozi LF, Navaza J, Charpilienne A, Garnier P, Poncet D, Lepault J. Geometric mismatches within the concentric layers of rotavirus particles: a potential regulatory switch of viral particle transcription activity. *J Virol.* 2008;82(6):2844-52.

Linhares AC. Rotavirus infection in Brazil: epidemiology and challenges for its control. *Cad Saude Publica.* 2000;16(3):629-46.

Linhares AC, Bresee JS. Rotavirus vaccines and vaccination in Latin America. *Rev Panam Salud Publica.* 2000;8(5):305-31.

Linhares AC, Gabbay YB, Freitas RB, da Rosa ES, Mascarenhas JD, Loureiro EC. Longitudinal study of rotavirus infections among children from Belém, Brazil. *Epidemiol Infect.* 1989;102(1):129-45.

Linhares AC, Pinheiro FP, Schmetz C, Müller G, Peters D. Duovirus (Rotavirus) in Belém, State of Para, Brazil (preliminary report). *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1977;19(4):278-9.

Linhares AC, Stupka JA, Ciapponi A, Bardach AE, Glujovsky D, Aruj PK, Mazzoni A, Rodriguez JA, Rearte A, Lanzieri TM, Ortega-Barria E, Colindres R. Burden and typing of rotavirus group A in Latin America and the Caribbean: systematic review and meta-analysis. *Rev Med Virol.* 2011; 21(2):89–109.

López S, Arias CF. Rotavirus-host cell interactions: an arms race. *Curr Opin Virol.*

2012;2(4):389-98.

Lopez S, Arias CF. Early steps in rotavirus cell entry. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2006;309:39-66.

Lorrot M, Vasseur M. How do the rotavirus NSP4 and bacterial enterotoxins lead differently to diarrhea? *Virologica*. 2007;4:31.

Lourenco MH, Nicolas JC, Cohen J, Scherrer R, Bricout F. Study of human rotavirus genome by electrophoresis: attempt of classification among strains isolated in France. *Ann Virol Inst Pasteur*. 1981;132:161-73.

Lu W, Duhamel GE, Hoshino Y, Benfield DA, Nelson EA, Hesse RA. Characterization of the bovine group A rotavirus strain neonatal calf diarrhea virus-Cody (NCDV-Cody). *J Clin Microbiol*. 1995;33(4):990-4.

Lundgren O, Peregrin AT, Persson K, Kordasti S, Uhnöo I, Svensson L. Role of the enteric nervous system in the fluid and electrolyte secretion of rotavirus diarrhea. *Science*. 2000;287(5452):491-5.

Lundgren O, Svensson L. Pathogenesis of rotavirus diarrhea. *Microbes Infect*. 2001;3(13):1145-56.

Levy K, Hubbard AE, Eisenberg JNS. Seasonality of rotavirus disease in the tropics: a systematic review and meta-analysis. *Int J Epidemiol* 2009;38(6):1487-96.

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

Malik SVS, Barbuddhe SB, Rawool DB, Vaidya VM, Sahare AM. Data sheet on Rotaviruses (Global status of Rotavirus infections in man and animals), In: *Animal Health and Production Compendium*, CAB International, Wallingford, UK. 2005.

Malik YS, Sharma K, Vaid N, Chakravarti S, Chandrashekar KM, Basera SS, Singh R, Minakshi, Prasad G, Gulati BR, Bhilegaonkar KN, Pandey AB. Frequency of group A rotavirus with mixed G and P genotypes in bovines: predominance of G3 genotype and its emergence in combination with G8/G10 types. *J Vet Sci*. 2012;13(3):271-8.

Manuja BK, Prasad M, Manuja A, Gulati BR, Prasad G. A novel genomic constellation (G10P[3]) of group A rotavirus detected from buffalo calves in northern India. *Virus Res.* 2008;138(1-2):36-42.

Marshall JA, Kennett ML, Rodger SM, Studdert MJ, Thompson WL, Gust ID. Virus and virus-like particles in the faeces of cats with and without diarrhoea. *Aust Vet J.* 1987;64(4):100-5.

Martella V, Bányai K, Ciarlet M, Iturriza-Gómara M, Lorusso E, De Grazia S, Arista S, Decaro N, Elia G, Cavalli A, Corrente M, Lavazza A, Baselga R, Buonavoglia C. Relationships among porcine and human P[6] rotaviruses: evidence that the different human P[6] lineages have originated from multiple interspecies transmission events. *Virology.* 2006;344(2):509-19.

Martella V, Bányai K, Lorusso E, Bellacicco AL, Decaro N, Camero M, Bozzo G, Moschidou P, Arista S, Pezzotti G, Lavazza A, Buonavoglia C. Prevalence of group C rotaviruses in weaning and post-weaning pigs with enteritis. *Vet Microbiol.* 2007a;123(1-3):26-33.

Martella V, Banyai K, Lorusso E, Decaro N, Bellacicco A, Desario C, Corrente M, Greco G, Moschidou P, Tempesta M, Arista S, Ciarlet M, Lavazza A, Bounovoglia C. Genetic heterogeneity in the VP7 of group C rotaviruses. *Virology.* 2007b;367(2):358-66.

Martella V, Bányai K, Matthijnssens J, Buonavoglia C, Ciarlet M. Zoonotic aspects of rotaviruses. *Vet Microbiol.* 2010;140(3-4):246-55.

Martella V, Ciarlet M, Lavazza A, Camarda A, Lorusso E, Terio V, Ricci D, Cariola F, Gentile M, Cavalli A, Camero M, Decaro N, Buonavoglia C. Lapine rotaviruses of the genotype P[22] are widespread in Italian rabbitries. *Vet Microbiol.* 2005;111(1-2):117-24.

Martella V, Ciarlet M, Pratelli A, Arista S, Terio V, Elia G, Cavalli A, Gentile M, Decaro N, Greco G, Cafiero MA, Tempesta M, Buonavoglia C. Molecular analysis of the VP7, VP4, VP6, NSP4, and NSP5/6 genes of a buffalo rotavirus strain: identification of the rare P[3] rhesus rotavirus-like VP4 gene allele. *J Clin Microbiol.* 2003;41(12):5665-75.

Martella V, Potgieter AC, Lorusso E, De Grazia S, Giammanco GM, Matthijnssens J, Bányai K, Ciarlet M, Lavazza A, Decaro N, Buonavoglia C. A feline rotavirus G3P[9] carries traces of multiple reassortment events and resembles rare human G3P[9] rotaviruses. *J Gen Virol*. 2011; 92(Pt 5):1214-21.

Martella V, Pratelli A, Elia G, Decaro N, Tempesta M, Buonavoglia C. Isolation and genetic characterization of two G3P5A[3] canine rotavirus strains in Italy. *J Virol Methods*. 2001;96(1):43-9.

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*. 2013;446:189-198.

Martínez M, Amarilla AA, Galeano ME, Aquino VH, Fariña N, Russomando G, Parra GI. Predominance of rotavirus G2P[4] and emergence of G12P[9] strains in Asunción, Paraguay, 2006-2007. *Arch Virol*. 2010 Apr;155(4):525-33.

Maruri-Avidal L, López S, Arias CF. Endoplasmic reticulum chaperones are involved in the morphogenesis of rotavirus infectious particles. *J Virol*. 2008;82(11):5368-80.

Mascarenhas JD, Linhares AC, Gabbay YB, Leite JP. Detection and characterization of rotavirus G and P types from children participating in a rotavirus vaccine trial in Belém, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002;97(1):113-7.

Mascarenhas JD, Linhares AC, Gabbay YB, Lima CS, Guerra Sde F, Soares LS, Oliveira DS, Lima JC, Macêdo O, Leite JP. Molecular characterization of VP4 and NSP4 genes from rotavirus strains infecting neonates and young children in Belém, Brazil. *Virus Res*. 2007;126(1-2):149-58.

Matsuda H. Construction of Phylogenetic Trees from Amino Acid Sequences using a Genetic Algorithm. *Genome Informatics*. 1995; 6: 19-28.

Matsumoto K, Hatano M, Kobayashi K, Hasegawa A, Yanazaki S, Nakata S, Chiba S, Kimura Y. An outbreak of gastroenteritis associated with acute rotaviral infection in schoolchildren. *J Inf Dis*. 1989;160(4):611-5.

Matsushima Y, Nakajima E, Nguyen TA, Shimizu H, Kano A, Ishimaru Y, Phan TG,

Ushijima H. Genome sequence of an unusual human G10P[8] rotavirus detected in Vietnam. *J Virol.* 2012;86(18):10236-7.

Matthews RE The classification and nomenclature of viruses. Summary of results of meetings of the International Committee on Taxonomy of Viruses in The Hague, September 1978. *Intervirology.* 1979;11(3):133-5

Matthijnssens J, Bilcke J, Ciarlet M, Martella V, Bányai K, Rahman M, Zeller M, Beutels P, Van Damme P, Van Ranst M. Rotavirus disease and vaccination: impact on genotype diversity. *Future Microbiol.* 2009;4(10):1303-16.

Matthijnssens J, Ciarlet M, Heiman E, Arijs I, Delbeke T, McDonald SM, Palombo EA, Iturriza-Gómara M, Maes P, Patton JT, 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. *J Virol.* 2008a;82(7):3204-19.

Matthijnssens J, Ciarlet M, McDonald SM, Attoui H, Bányai K, Brister JR, Buesa J, Esona MD, Estes MK, Gentsch JR, Iturriza-Gómara M, Johne R, Kirkwood CD, Martella V, Mertens PP, Nakagomi O, Parreño V, Rahman M, Ruggeri FM, Saif LJ, Santos N, Steyer A, Taniguchi K, Patton JT, Desselberger U, Van Ranst M. Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). *Arch Virol.* 2011;156(8):1397-413.

Matthijnssens J, Ciarlet M, Rahman M, Attoui H, Bányai K, Estes MK, Gentsch JR, Iturriza-Gómara M, Kirkwood CD, Martella V, Mertens PP, Nakagomi O, Patton JT, Ruggeri FM, Saif LJ, Santos N, Steyer A, Taniguchi K, Desselberger U, Van Ranst M. Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. *Arch Virol.* 2008b;153(8):1621-9.

Matthijnssens J, Heylen E, Zeller M, Rahman M, Lemey P, Van Ranst M. Phylodynamic analyses of rotavirus genotypes G9 and G12 underscore their potential for swift global spread. *Mol Biol Evol.* 2010;27(10):2431-6.

Matthijnssens J, Joelsson DB, Warakomski DJ, Zhou T, Mathis PK, Van Maanen MH, Ranheim TS, Ciarlet M. Molecular and biological characterization of the 5 human-bovine rotavirus (WC3)-based reassortant strains of the pentavalent rotavirus vaccine,

RotaTeq. *Virology*. 2010a;403(2):111-127.

Matthijnssens J, Taraporewala ZF, Yang H, Rao S, Yuan L, Cao D, Hoshino Y, Mertens PP, Carner GR, McNeal M, Sestak K, Van Ranst M, Patton JT. Simian rotaviruses possess divergent gene constellations that originated from interspecies transmission and reassortment. *J Virol*. 2010b;84(4):2013-26.

Matthijnssens J, Miño S, Papp H, Potgieter C, Novo L, Heylen E, Zeller M, Garaicoechea L, Badaracco A, Lengyel G, Kisfali P, Cullinane A, Collins PJ, Ciarlet M, O'Shea H, Parreño V, Bányai K, Barrandeguy M, Van Ranst M. Complete molecular genome analyses of equine rotavirus A strains from different continents reveal several novel genotypes and a largely conserved genotype constellation. *J Gen Virol*. 2012a;93(Pt 4):866-75.

Matthijnssens J, Rahman M, Yang X, Delbeke T, Arijs I, Kabue JP, Muyembe JJ, Van Ranst M. G8 rotavirus strains isolated in the Democratic Republic of Congo belong to the DS-1-like genogroup. *J Clin Microbiol*. 2006;44(5):1801-9.

Matthijnssens J, Otto PH, Ciarlet M, Desselberger U, Van Ranst M, Johne R. VP6-sequence-based cutoff values as a criterion for rotavirus species demarcation. *Arch Virol*. 2012b;157(6):1177-82.

Matthijnssens J, Van Ranst M. Genotype constellation and evolution of group A rotaviruses infecting humans. *Curr Opin Virol*. 2012;2(4):426-33.

Mattion NM, Cohen J, Estes Mk. The rotavirus proteins. In: Kapikian AZ. *Viral infections of the gastrointestinal tract*. 2ed. New York. Marcel-Dekker Inc. 1994. p169-249.

Maunula L, Svensson L, von Bonsdorff CH. A family outbreak of gastroenteritis caused by group C rotavirus. *Arch Virol*. 1992;124(3-4):269-78.

Mawatari T, Taneichi A, Kawagoe T, Hosokawa M, Togashi K, Tsunemitsu H. Detection of a bovine group C rotaviruses from adult cows with diarrhea and reduced milk production. *J Vet Sci*. 2004;66(7):887-90.

McDonald SM, Patton JT. Assortment and packaging of the segmented rotavirus

genome. *Trends Microbiol.* 2011;19(3):136-44.

McNulty MS. Rotavirus infections in calves. *Ann Rech Vet.* 1983;14(4):427-32.

Mebus CA, Wyatt RG, Kapikian AZ. Intestinal lesions induced in gnotobiotic calves by the virus of human infantile gastroenteritis. *Vet Pathol.* 1977;14(3):273-82.

Medici MC, Abelli LA, Guerra P, Dodi I, Dettori G, Chezzi C. Case report: detection of rotavirus RNA in the cerebrospinal fluid of a child with rotavirus gastroenteritis and meningism. *J Med Virol.* 2011;83(9):1637-40.

Medici MC, Abelli LA, Martinelli M, Martella V. Molecular characterization of group C rotaviruses detected in children in Italy. *J Clin Virol.* 2009;44(1):62-5.

Médici KC, Barry AF, Alfieri AF, Alfieri AA. VP6 gene diversity in Brazilian strains of porcine group C rotavirus. *Genet Mol Res.* 2010;9(1):506-13.

Meleg E, Bányai K, Martella V, Jiang B, Kocsis B, Kisfali P, Meleg B, Szucs G. Detection and quantification of group C rotaviruses in communal sewage. *Appl Environ Microbiol.* 2008;74(11):3394-9.

Mendes VM, De Beer MC, Goosen GH, Steele AD. Isolation and preliminary characterization of a caprine rotavirus. *Onderstepoort J Vet Res.* 1994;61(4):291-4.

Ministério da Saúde (MS). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Biossegurança em laboratórios biomédicos e de microbiologia. 3ª Ed. Brasília-DF. Editora MS. Título original: Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories – 4th edition – May of 1999. 2006.

Mitui MT, Bozdayi G, Dalgic B, Bostanci I, Nishizono A, Ahmed K. Molecular characterization of a human group C rotavirus detected first in Turkey. *Virus Genes.* 2009;39(2):157-64.

Miyazaki A, Kuga K, Suzuki T, Kohmoto M, Katsuda K, Tsunemitsu H. Genetic diversity of group A rotaviruses associated with repeated outbreaks of diarrhea in a farrow-to-finish farm: identification of a porcine rotavirus strain bearing a novel VP7 genotype, G26. *Vet Res.* 2011;42(1):112.

Molinari BLD, Lorenzetti E, Otonel RAA, Alfieri AF, Alfieri AA. Species H rotavirus detected in piglets with diarrhea, Brazil, 2012. *Emerg Infect Dis.* 2014;20(6):1019-1022.

Molyneaux PJ. Human immunity to rotavirus. *J Med Microbiol.* 1995;43(6):397-404.

Montenegro FM, Correia JB, Rodrigues Falbo A, Dove W, Nakagomi T, Nakagomi O, Cuevas LE, Cunliffe NA, Hart CA. Anticipating rotavirus vaccines in Brazil: detection and molecular characterization of emerging rotavirus serotypes G8 and G9 among children with diarrhoea in Recife, Brazil. *J Med Virol.* 2007 Mar;79(3):335-40.

Moon S, Humphrey CD, Kim JS, Baek LJ, Song JW, Song KJ, Jiang B. First detection of Group C rotavirus in children with acute gastroenteritis in South Korea. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17:244–247.

Morillo SG, Luchs A, Cilli A, Carmona RC, Neme SN, Timenetsky MC. Rotavirus genotype G4P[8] and enteric adenovirus in HIV-positive patients with and without diarrhoea in São Paulo State, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2010a;104(2):165-7.

Morillo SG, Luchs A, Cilli A, Costa FF, Carmona Rde C, Timenetsky Mdo C. Characterization of rotavirus strains from day care centers: pre- and post-rotavirus vaccine era. *J Pediatr (Rio J).* 2010b;86(2):155-8.

Morillo SG, Luchs A, Cilli A, Ribeiro CD, Calux SJ, Carmona Rde C, Timenetsky Mdo C. Norovirus 3rd Generation kit: an improvement for rapid diagnosis of sporadic gastroenteritis cases and valuable for outbreak detection. *J Virol Methods.* 2011;173(1):13-6.

Morin M, Magar R, Robinson Y. Porcine group C rotavirus as a cause of neonatal diarrhea in a Quebec swine herd. *Can J Vet Res.* 1990;54(3):385-9.

Moyo SJ, Gro N, Kirsti V, Matee MI, Kitundu J, Maselle SY, Langeland N, Myrmel H. Prevalence of enteropathogenic viruses and molecular characterization of group A rotavirus among children with diarrhea in Dar es Salaam Tanzania. *BMC Public Health.* 2007;7:359.

Muhsen K, Shulman L, Rubinstein U, Kasem E, Kremer A, Goren S, Cohen D, Ephros M. Incidence, characteristics, and economic burden of rotavirus gastroenteritis associated with hospitalization of Israeli children <5 years of age, 2007-2008. *J Infect Dis.* 2009;200 Suppl 1:S254-63.

Mukherjee A, Nayak MK, Roy T, Ghosh S, Naik TN, Kobayashi N, Chawla-Sarkar M. Detection of human G10 rotavirus strains with similarity to bovine and bovine-like equine strains from untypable samples. *Infect Genet Evol.* 2012;12(2):467-70.

Mukhopadhyaya I, Anbu D, Iturriza-Gomara M, Gray JJ, Brown DW, Kavanagh O, Estes MK, Kang G. Anti-VP6 IgG antibodies against group A and group C rotaviruses in South India. *Epidemiol Infect.* 2010;138:442-447.

Munford V, Gilio AE, de Souza EC, Cardoso DM, Cardoso Dd, Borges AM, Costa PS, Melgaço IA, Rosa H, Carvalho PR, Goldani MZ, Moreira ED Jr, Santana C, El Khoury A, Ikedo F, Rácz ML. Rotavirus gastroenteritis in children in 4 regions in Brazil: a hospital-based surveillance study. *J Infect Dis.* 2009;200 Suppl 1:S106-13.

Muniappa L, Georgiev KG, Dimitrov D, Mitov KB, Haralambiev EH. Isolation of rotavirus from buffalo calves. *Vet Rec.* 1987;120(1):23.

Muñoz M, Alvarez M, Lanza I, Cármenes P. An outbreak of diarrhoea associated with atypical rotaviruses in goat kids. *Res Vet Sci.* 1995;59(2):180-2.

Murakami T, Hirano N, Inoue A, Chitose K, Tsuchiya K, Ono K, Naito Y, Yanagihara T. Protective effect of orally administered immunoglobulins against experimental calf diarrhea. *Nihon Juigaku Zasshi.* 1986;48(2):237-45.

Murphy FA, Gibbs EPJ, Horzinek MC, Studdert MJ. Reoviridae. In: Murphy FA, Gibbs EPJ, Horzinek MC, Studdert MJ (eds). *Veterinary Virology*, Academic Press, USA, 1999. p. 391-404.

Nagashima S, Kobayashi N, Ishino M, Alam MM, Ahmed MU, Paul SK, Ganesh B, Chawla-Sarkar M, Krishnan T, Naik TN, Wang YH. Whole genomic characterization of a human rotavirus strain B219 belonging to a novel group of the genus Rotavirus. *J Med Virol.* 2008;80(11):2023-33.

Nakagomi O, Nakagomi T. Genetic diversity and similarity among mammalian rotaviruses in relation to interspecies transmission of rotavirus. *Arch Virol.* 1991;120(1-2):43-55.

Nakagomi O, Nakagomi T. Genomic relationships among rotaviruses recovered from various animal species as revealed by RNA-RNA hybridization assays. *Res Vet Sci.* 2002;73(3):207-14.

Nakagomi T, Nakagomi O. Human rotavirus HCR3 possesses a genomic RNA constellation indistinguishable from that of feline and canine rotaviruses. *Arch Virol.* 2000;145(11):2403-9.

Nakagomi O, Nakagomi T, Akatani K, Ikegami N. Identification of rotavirus genogroups by RNA-RNA hybridization. *Mol Cell Probes.* 1989;3(3):251-61.

Nakagomi O, Ohshima A, Aboudy Y, Shif I, Mochizuki M, Nakagomi T, Gottlieb-Stematsky T. Molecular identification by RNA-RNA hybridization of a human rotavirus that is closely related to rotaviruses of feline and canine origin. *J Clin Microbiol.* 1990;28(6):1198-203.

Nakata S, Estes MK, Graham DY, Loosle R, Tao H, Wang SH, Saif LJ, Melnick JL. Antigenic characterization and ELISA detection of adult diarrhea rotaviruses. *J Infect Dis.* 1986;154(3):448-55. Erratum in: *J Infect Dis.* 1987;155(1):162.

Nielsen NM, Eugen-Olsen J, Aaby P, Mølbak K, Rodrigues A, Fischer TK. Characterisation of rotavirus strains among hospitalised and non-hospitalised children in Guinea-Bissau, 2002 A high frequency of mixed infections with serotype G8. *J Clin Virol.* 2005;34(1):13-21.

Nilsson M, Sigstam G, Svensson L. Antibody prevalence and specificity to group C rotavirus in Swedish sera. *J Med Virol.* 2000a;60(2):210-5.

Nilsson M, Svenungsson B, Hedlund KO, Uhnöo I, Lagergren A, Akre T, Svensson L. Incidence and genetic diversity of group C rotavirus among adults. *J Infect Dis.* 2000b;182(3):678-84.

Offit PA. Host factors associated with protection against rotavirus disease: the skies

are clearing. *J Infect Dis.* 1996;174 Suppl 1:S59-64.

Offit PA, Clark HF. Vaccines for enteric viral pathogens. In: BlaserMJ, Smith PD, Ravdin JI, Greenberg HB, Guerrant RL, eds. *Infections of the gastrointestinal tract.* New York: Raven Press; 1995. p. 1471-8.

Offit PA, Shaw RD, Greenberg HB. Passive protection against rotavirus-induced diarrhea by monoclonal antibodies to surface proteins VP3 and VP7. *J Virol.* 1986;58(2):700-3.

Oishi I, Yamazaki K, Minekawa Y. An occurrence of diarrheal cases associated with group C rotavirus in adults. *Microbiol Immunol.* 1993;37(6):505-9.

Okada N, Matsumoto Y. Bovine rotavirus G and P types and sequence analysis of the VP7 gene of two G8 bovine rotaviruses from Japan. *Vet Microbiol.* 2002;84(4):297-305.

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

O'Ryan M. The ever-changing landscape of rotavirus serotypes. *Pediatr Infect Dis J.* 2009;28(3 Suppl):S60-2.

O'Ryan ML, Matson DO, Estes MK, Pickering LK. Anti-rotavirus G type-specific and isotype-specific antibodies in children with natural rotavirus infections. *J Infect Dis.* 1994;169(3):504-11.

Oseto M, Yamashita Y, Hattori M, Mori M, Inoue H, Ishimaru Y, Matsumo S. Serial propagation of human group C rotavirus in a continuous cell line (CaCo-2). *J Clin Exp Med.* 1994;168:177-8.

O'Shea H, Mulherin E, Matthijnssens, McCusker MP, Collins PJ, Cashman O, Gunn L, Beltman ME, Fanning S. Complete genomic sequence analyses of the first group A giraffe rotavirus reveals close evolutionary relationship with rotavirus infecting other members of the Artiodactyla. *Vet Microbiol.* 2014;170:151-156.

Otto P, Liebler-Tenorio EM, 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 Dis.* 2006;50(3):411-8.

Otto P, Schulze P, Herbst W. Demonstration of group C rotaviruses in fecal samples of diarrheic dogs in Germany. *Arch Virol.* 1999;144(12):2467-73.

Padilla-Noriega L, Dunn SJ, López S, Greenberg HB, Arias CF. Identification of two independent neutralization domains on the VP4 trypsin cleavage products VP5* and VP8* of human rotavirus ST3. *Virology.* 1995;206(1):148-54.

Page NA, de Beer MC, Seheri LM, Dewar JB, Steele AD. The detection and molecular characterization of human G12 genotypes in South Africa. *J Med Virol.* 2009;81(1):106-13.

Page N, Esona M, Seheri M, Nyangao J, Bos P, Mwenda J, Steele D. Characterization of genotype G8 strains from Malawi, Kenya, and South Africa. *J Med Virol.* 2010;82(12):2073-81.

Palombo EA. Genetic analysis of Group A rotaviruses: evidence for interspecies transmission of rotavirus genes. *Virus Genes.* 2002;24(1):11-20.

Pando V, Isa P, Arias CF, López S. Influence of calcium on the early steps of rotavirus infection. *Virology.* 2002;295(1):190-200.

Parashar UD, Bresee JS, Gentsch JR, Glass RI. Rotavirus. *Emerg Infect Dis.* 1998;4(4):561-70.

Parashar UD, Burton A, Lanata C, Boschi-Pinto C, Shibuya K, Steele D, Birmingham M, Glass RI. Global mortality associated with rotavirus disease among children in 2004. *J Infect Dis.* 2009;200 Suppl 1:S9-S15.

Parashar UD, Gibson CJ, Bresse JS, Glass RI. Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerg Infect Dis* 2006;12:304–6.

Park SI, Jeong YJ, Kim HJ, Park JG, Kang SY, Woo SK, Kim CH, Jung CH, Kang MI, Cho KO. Genetically diverse group C rotaviruses cause sporadic infection in Korean

calves. *J Vet Med Sci.* 2011;73(4):479-82.

Parra GI. Seasonal shifts of group A rotavirus strains as a possible mechanism of persistence in the human population. *J Med Virol.* 2009;81(3):568-71.

Parra GI, Vidales G, Gomez JA, Fernandez FM, Parreño V, Bok K. Phylogenetic analysis of porcine rotavirus in Argentina: increasing diversity of G4 strains and evidence of interspecies transmission. *Vet Microbiol.* 2008;126(1-3):243-50.

Parreño V, Béjar C, Vagnozzi A, Barrandeguy M, Costantini V, Craig MI, Yuan L, Hodgins D, Saif L, Fernández F. Modulation by colostrum-acquired maternal antibodies of systemic and mucosal antibody responses to rotavirus in calves experimentally challenged with bovine rotavirus. *Vet Immunol Immunopathol.* 2004;100(1-2):7-24.

Patel M, Pedreira C, De Oliveira LH, Tate J, Orozco M, Mercado J, Gonzalez A, Malespin O, Amador JJ, Umaña J, Balmaseda A, Perez MC, Gentsch J, Kerin T, Hull J, Mijatovic S, Andrus J, Parashar U. Association between pentavalent rotavirus vaccine and severe rotavirus diarrhea among children in Nicaragua. *JAMA.* 2009;301(21):2243-51.

Patel MM, Steele D, Gentsch JR, Wecker J, Glass RI, Parashar UD. Real-world impact of rotavirus vaccination. *Pediatr Infect Dis J.* 2011;30(1 Suppl):S1-5.

Patton JT. Structure and function of the rotavirus RNA-binding proteins. *J Gen Virol.* 1995;76 (Pt 11):2633-44.

Patton JT. Rotavirus diversity and evolution in the post-vaccine world. *Discov Med.* 2012;13(68):85-97.

Patton JT, Chnaiderman J, Spencer E. Open reading frame in rotavirus mRNA specifically promotes synthesis of double-stranded RNA: template size also affects replication efficiency. *Virology.* 1999;264(1):167-80.

Patton JT, Silvestri LS, Tortorici MA, Vasquez-Del Carpio R, Taraporewala ZF. Rotavirus genome replication and morphogenesis: role of the viroplasm. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2006;309:169-87.

Patz JA, Epstein PR, Burke TA, Balbus JM. Global climate change and emerging infectious diseases. *JAMA* 1996;275(3):217-23.

Payne DC, Staat MA, Edwards KM, Szilagyi PG, Weinberg GA, Hall CB, Chappell J, Curns AT, Wikswo M, Tate JE, Lopman BA, Parashar UD; New Vaccine Surveillance Network (NVSN). Direct and indirect effects of rotavirus vaccination upon childhood hospitalizations in 3 US Counties, 2006-2009. *Clin Infect Dis*. 2011;53(3):245-53.

Pazos F, Helmer-Citterich M, Ausiello G, Valencia A. Correlated mutations contain information about protein-protein interaction. *J Mol Biol*. 1997;271(4):511-23.

Peñaranda ME, Cubitt WD, Sinarachatanant P, Taylor DN, Likanonsakul S, Saif L, Glass RI. Group C rotavirus infections in patients with diarrhea in Thailand, Nepal, and England. *J Infect Dis*. 1989;160(3):392-7.

Pereira HG, Leite JP, Azeredo RS, de Farias V, Suttmoller F. An atypical rotavirus detected in a child with gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1983;78(3):245-50.

Pereira HG, Linhares AC, Candeias JAN, Glass RI. National laboratory surveillance of viral agents of gastroenteritis in Brazil. *Bull Pan Am Health Organ*. 1993;27(3):224-33.

Petric M, Middleton PJ, Rapley WA, Mehren KG, Grant C. A survey of zoo mammals for antibody to rotavirus. *Can J Comp Med*. 1981;45(3):327-9.

Phan TG, Nishimura S, Okame M, Nguyen TA, Khamrin P, Okitsu S, Maneekarn N, Ushijima H. Virus diversity and an outbreak of group C rotavirus among infants and children with diarrhea in Maizuru city, Japan during 2002-2004. *J Med Virol*. 2004;74(1):173-9.

Pietruchinski E, Benati F, Lauretti F, Kisielius J, Ueda M, Volotão EM, Soares CC, Hoshino Y, Linhares RE, Nozawa C, Santos N. Rotavirus diarrhea in children and adults in a southern city of Brazil in 2003: distribution of G/P types and finding of a rare G12 strain. *J Med Virol*. 2006;78(9):1241-9.

Pietsch C, Petersen L, Patzer L, Liebert UG. Molecular characteristics of German G8P[4] rotavirus strain GER1H-09 suggest that a genotyping and subclassification update is required for G8. *J Clin Microbiol.* 2009;47(11):3569-76.

Prasad BV, Burns JW, Marietta E, Estes MK, Chiu W. Localization of VP4 neutralization sites in rotavirus by three-dimensional cryo-electron microscopy. *Nature.* 1990;343(6257):476-9.

Prasad BV, Chiu W. Structure of rotavirus. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1994;185:9-29.

Prasad BV, Rothnagel R, Zeng CQ, Jakana J, Lawton JA, Chiu W, Estes MK. Visualization of ordered genomic RNA and localization of transcriptional complexes in rotavirus. *Nature.* 1996;382(6590):471-3.

Pratelli A, Martella V, Tempesta M, Buonavoglia C. Characterization by polymerase chain reaction of ruminant rotaviruses isolated in Italy. *New Microbiol.* 1999;22(2):105-9.

Puntel M, Fondevila NA, Blanco Viera J, O'Donnell VK, Marcovecchio JF, Carrillo BJ, Schudel AA. Serological survey of viral antibodies in llamas (*Lama glama*) in Argentina. *Zentralbl Veterinarmed B.* 1999;46(3):157-61.

Qian Y, Green KY. Human rotavirus strain 69M has a unique VP4 as determined by amino acid sequence analysis. *Virology.* 1991;182(1):407-12.

Rahman M, Banik S, Faruque AS, Taniguchi K, Sack DA, Van Ranst M, Azim T. Detection and characterization of human group C rotaviruses in Bangladesh. *J Clin Microbiol.* 2005a;43(9):4460-5.

Rahman M, Matthijnssens J, Yang X, Delbeke T, Arijs I, Taniguchi K, Iturriza-Gómara M, Iftekharuddin N, Azim T, Van Ranst M. Evolutionary history and global spread of the emerging g12 human rotaviruses. *J Virol.* 2007;81(5):2382-90.

Rahman M, Sultana R, Podder G, Faruque AS, Matthijnssens J, Zaman K, Breiman RF, Sack DA, Van Ranst M, Azim T. Typing of human rotaviruses: nucleotide mismatches between the VP7 gene and primer are associated with genotyping failure. *Virol J.* 2005b;2:24.

Ramachandran M, Kirkwood CD, Unicomb L, Cunliffe NA, Ward RL, Bhan MK, Clark HF, Glass RI, Gentsch JR. Molecular characterization of serotype G9 rotavirus strains from global collection. *Virology*. 2000;278(2):436-44.

Ramani S, Iturriza-Gomara M, Jana AK, Kuruvilla KA, Gray JJ, Brown DW, Kang G. Whole genome characterization of reassortant G10P[11] strain (N155) from a neonate with symptomatic rotavirus infection: identification of genes of human and animal rotavirus origin. *J Clin Virol*. 2009;45(3):237-44.

Ramani S, Kang G. Burden of disease & molecular epidemiology of group A rotavirus infections in India. *Indian J Med Res*. 2007;125(5):619-32.

Ramig RF. Pathogenesis of intestinal and systemic rotavirus infection. *J Virol*. 2004;78(19):10213-20.

Rehwinkel J, Reis e Sousa C. RIGorous detection: exposing virus through RNA sensing. *Science*. 2010;327(5963):284-6.

Ribas Mde L, Nagashima S, Calzado A, Acosta G, Tejero Y, Cordero Y, Piedra D, Kobayashi N. Emergence of G9 as a predominant genotype of human rotaviruses in Cuba. *J Med Virol*. 2011;83(4):738-44.

Ribeiro LR, Giuberti RS, Barreira DM, Saick KW, Leite JP, Miagostovich MP, Spano LC. Hospitalization due to norovirus and genotypes of rotavirus in pediatric patients, state of Espírito Santo. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2008;103(2):201-6.

Richardson SC, Bishop RF. Homotypic serum antibody responses to rotavirus proteins following primary infection of young children with serotype 1 rotavirus. *J Clin Microbiol*. 1990;28(9):1891-7.

Riepenhoff-Talty M, Morse K, Hui Wang C, Shapiro C, Roberts J, Welter M, Allen M, Evans MJ, Flanagan TD. Epidemiology of group C rotavirus infection in western New York women of childbearing age. *J Clin Microbiol*. 1997;35(2):486-8.

Rodger SM, Bishop RF, Holmes IH. Detection of a rotavirus-like agent associated with diarrhea in an infant. *J Clin Microbiol*. 1982;16(4):724-6.

Rojas M, Arias CF, López S. Protein kinase R is responsible for the phosphorylation of eIF2 α in rotavirus infection. *J Virol.* 2010;84(20):10457-66.

Rossignol JF, El-Gohary YM. Nitazoxanide in the treatment of viral gastroenteritis: a randomized double-blind placebo-controlled clinical trial. *Aliment Pharmacol Ther.* 2006;24(10):1423-30.

Ruiz MC, Leon T, Diaz Y, Michelangeli F. Molecular biology of rotavirus entry and replication. *ScientificWorldJournal.* 2009a;9:1476-97.

Ruiz VLA, Brandão PE, Gregori F, Rodriguez CAR, Souza SLP, Jerez JA. Isolation of rotavirus from asymptomatic dogs in Brazil. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2009b; 61(4):996-9.

Ruiz-Palacios GM, Perez-Schael I, Velazquez FR, Abate H, Breuer T, Clemens SC, Chevart B, Espinoza F, Gillard P, Innis BL, Cervantes Y, Linhares AC, Lopez P, Macias-Parra M, Ortega-Barria E, Richardson V, Rivera-Medina DM, Rivera L, Salinas B, Pavia-Ruz N, et al. Safety and efficacy of an attenuated vaccine against severe rotavirus gastroenteritis. *N Engl J Med.* 2006;354(1):11-22.

Sáfadi MA, Berezin EN, Munford V, Almeida FJ, de Moraes JC, Pinheiro CF, Racz ML. Hospital-based surveillance to evaluate the impact of rotavirus vaccination in São Paulo, Brazil. *Pediatr Infect Dis J.* 2010;29(11):1019-22.

Saif LJ, Bohl EH, Theil KW, Cross RF, House JA. Rotavirus-like, calicevirus-like, and 23-nm virus-like particles associated with diarrhea in young pigs. *J Clin Microbiol.* 1980;12(1):105-11.

Saif LJ, Fernandez FM. Group A rotavirus veterinary vaccines. *J Infect Dis.* 1996;174 Suppl 1:S98-106.

Saif LJ, Jiang B. Nongroup A rotaviruses of humans and animals. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1994;185:339-71.

Saif LJ, Rosen B, Parwani A. Animal rotaviruses. In: Kapikian A (Ed). *Viral infections of the gastrointestinal tract.* Marcel Dekker, Inc, New York, 1994. p. 279-367.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual,* Cold

Spring Harbor Laboratory, 1989.

Sánchez-Fauquier A, Roman E, Colomina J, Wilhelmi I, Glass RI, Jiang B. First detection of grupo C rotavirus in children with acute diarrhea in Spain. *Arch Virol.* 2003; 148(2):399-404.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1977;74(12):5463-7.

Santos N, Clark HF, Hoshino Y, Gouvea V. Relationship among serotype G3P5A rotavirus strains isolated from different host species. *Mol Cell Probes.* 1998a;12:379-86.

Santos N, Gouvea V, Timenetsky MC, Clark HF, Riepenhoff-Talty M, Garbarg-Chenon A. Comparative analysis of VP8* sequences from rotaviruses possessing M37-like VP4 recovered from children with and without diarrhoea. *J Gen Virol.* 1994b;75:1775-80.

Santos N, Hoshino Y. Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *Rev Med Virol.* 2005;15(1):29-56.

Santos N, Lima RC, Pereira CF, Gouvea V. Detection of rotavirus types G8 and G10 among Brazilian children with diarrhea. *J Clin Microbiol.* 1998b Sep;36(9):2727-9.

Santos N, Riepenhoff-Talty M, Clark HF, Offit P, Gouvea V. VP4 genotyping of human rotavirus in the United States. *J Clin Microbiol.* 1994a Jan;32(1):205-8.

Santos NSO, Soares CC. *Viroses Entericas.* In: *Introducao a Virologia Humana.* Santos NSO, Romanos MTV, Wigg MD, Guanabara & Koogan; Rio de Janeiro. 2008. p. 147-76.

Sartori AM, Valentim J, de Soárez PC, Novaes HM. Rotavirus morbidity and mortality in children in Brazil. *Rev Panam Salud Publica.* 2008;23(2):92-100.

Sasaki S, Horie Y, Nakagomi T, Oseto M, Nakagomi O. Group C rotavirus NSP4 induces diarrhea in neonatal mice. *Arch Virol.* 2001;146:801-806.

Sattar SA, Ijaz MK, Johnson-Lussenburg CM, Springthorpe VS. Effect of relative humidity on the airborne survival of rotavirus SA11. *Appl Environ Microbiol.* 1984;47(4):879-81.

Schlafer DH, Scott FW. Prevalence of neutralizing antibody to the calf rotavirus in New York cattle. *Cornell Vet.* 1979;69(3):262-71.

Schnagl RD, Boniface K, Cardwell P, McCarthy D, Ondracek C, Coulson B, Erlich J, Morey F. Incidence of group C human rotavirus in central Australia and sequence variation of the VP7 and VP4 genes. *J Clin Microbiol.* 2004;42(5):2127-133.

Schwers A, Hoyois P, Chappuis G, Dagenais L, Pastoret PP. Propagation of bovine rotavirus by cats and dogs. *Ann Rech Vet.* 1982;13(4):303-8.

Selim SA, Aziz KM, Sarker AJ, Rahman H. Rotavirus infection in calves in Bangladesh. *Vet Res Commun.* 1991;15(4):327-33.

Shaw AL, Rothnagel R, Chen D, Ramig RF, Chiu W, Prasad BV. Three-dimensional visualization of the rotavirus hemagglutinin structure. *Cell.* 1993;74(4):693-701.

Shen S, Burke B, Desselberger U. Nucleotide sequences of the VP4 and VP7 genes of a Chinese lamb rotavirus: evidence for a new P type in a G10 type virus. *Virology.* 1993;197(1):497-500.

Sherbakov DY, Triboy TI. Effect of co-evolving amino acid residues on topology of phylogenetic trees. *Biochemistry (Mosc).* 2007;72(12):1363-7.

Sigolo de San Juan C, Bellinzoni RC, Mattion N, La Torre J, Scodeller EA. Incidence of group A and atypical rotaviruses in Brazilian pig herds. *Res Vet Sci.* 1986;41(2):270-2.

Silva LC, Sanches AA, Gregori F, Brandão PE, Alfieri AA, Headley SA, Jerez JA. First description of group A rotavirus from fecal samples of ostriches (*Struthio camelus*). *Res Vet Sci.* 2012;93(2):1066-9.

Silvestri LS, Taraporewala ZF, Patton JT. Rotavirus replication: plus-sense templates for double-stranded RNA synthesis are made in viroplasms. *J Virol.* 2004;78(14):7763-74.

Siqueira AA, Santelli AC, Alencar LR Jr, Dantas MP, Dimech CP, Carmo GM, Santos DA, Alves RM, Lucena MB, Morais M, Assis RM, Fialho A, Mascarenhas JD, Costa M, Linhares AC, Leite JP, Araujo WN, Hatch DL. Outbreak of acute gastroenteritis in young children with death due to rotavirus genotype G9 in Rio Branco, Brazilian Amazon region, 2005. *Int J Infect Dis.* 2010;14(10):e898-903.

Snodgrass DR, Browning G. Enteric vaccines for farm animals and horses. In: Peters AR (ed) *Vaccines for veterinary applications.* Oxford, Butterworth-Heinemann. 1993. p. 73-95.

Snodgrass DR, Herring AJ, Campbell I, Inglis JM, Hargreaves FD. Comparison of atypical rotaviruses from calves, piglets, lambs and man. *J Gen Virol.* 1984;65 (Pt 5):909-14.

Snodgrass DR, Wells PW. Rotavirus infection in lambs: studies on passive protection. *Arch Virol.* 1976;52(3):201-5.

Soma J, Tsunemitsu H, Miyamoto T, Suzuki G, Sasaki T, Suzuki T. Whole-genome analysis of two bovine rotavirus C strains: Shintoku and Toyama. *J Gen Virol.* 2013; 94:128-135.

Souza DF, Kisielius JJ, Ueda M, Gabbay YB, Carmona RCC, Timenetsky MCST, Mascarenhas JDP, Takimoto S, Tanaka H. An outbreak of group C rotavirus gastroenteritis among adults living in Valentim Gentil, São Paulo State, Brazil. *J Diarrhoeal Dis Res.* 1998;16(2):59-65.

Steele AD, Cunliffe N, Tumbo J, Madhi SA, De Vos B, Bouckenoghe A. A review of rotavirus infection in and vaccination of human immunodeficiency virus-infected children. *J Infect Dis.* 2009;200 Suppl 1:S57-62.

Steele AD, Geyer A, Gerdes GH. Rotavirus infections. In: Coetzer JAW, Tustin RC (eds), *Infectious diseases of Livestock,* Oxford University Press, Southern Africa, 2004. p. 1256-64.

Steele AD, James VLA. Seroepidemiology of human group C rotavirus in South Africa. *S Afr Med J.* 1999;89:1073-4.

Steele AD, Neuzil KM, Cunliffe NA, Madhi SA, Bos P, Ngwira B, Witte D, Todd S, Louw C, Kirsten M, Aspinall S, Van Doorn LJ, Bouckenoghe A, Suryakiran PV, Han HH. Human rotavirus vaccine Rotarix™ provides protection against diverse circulating rotavirus strains in African infants: a randomized controlled trial. *BMC Infect Dis.* 2012;12:213.

Steyer A, Bajzelj M, Iturriza-Gómara M, Mladenova Z, Korsun N, Poljsak-Prijatelj M. Molecular analysis of human group A rotavirus G10P[14] genotype in Slovenia. *J Clin Virol.* 2010;49(2):121-5.

Steyer A, Poljsak-Prijatelj M, Bufon T, Sedmak M, Vidmar L, Mijovski JZ, Marin J. First detection of group C rotavirus in patients with gastroenteritis in Slovenia. *J Med Virol.* 2006;78(9):1250-5.

Stupka JA, Degiuseppe JI, Parra GI; Argentinean National Rotavirus Surveillance Network. Increased frequency of rotavirus G3P[8] and G12P[8] in Argentina during 2008-2009: whole-genome characterization of emerging G12P[8] strains. *J Clin Virol.* 2012;54(2):162-7.

Svensson L, Sheshberadaran H, Vesikari T, Norrby E, Wadell G. Immune response to rotavirus polypeptides after vaccination with heterologous rotavirus vaccines (RIT 4237, RRV-1). *J Gen Virol.* 1987;68 (Pt 7):1993-9.

Takanashi J, Miyamoto T, Ando N, Kubota T, Oka M, Kato Z, Hamano S, Hirabayashi S, Kikuchi M, Barkovich AJ. Clinical and radiological features of rotavirus cerebellitis. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2010;31(9):1591-5.

Tamura K, Dudley J, Nei M & Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution.* 2007;24:1596-9.

Taniguchi K, Nishikawa K, Urasawa T, Urasawa S, Midthun K, Kapikian AZ, Gorziglia M. Complete nucleotide sequence of the gene encoding VP4 of a human rotavirus (strain K8) which has unique VP4 neutralization epitopes. *J Virol.* 1989;63(9):4101-6.

Taniguchi K, Urasawa T, Kobayashi N, Gorziglia M, Urasawa S. Nucleotide sequence of VP4 and VP7 genes of human rotaviruses with subgroup I specificity and long RNA pattern: implication for new G serotype specificity. *J Virol.* 1990;64(11):5640-4.

Taniguchi K, Urasawa T, Urasawa S. Species specificity and interspecies relatedness in VP4 genotypes demonstrated by VP4 sequence analysis of equine, feline, and canine rotavirus strains. *Virology*. 1994;200(2):390-400.

Tapia MD, Armah G, Breiman RF, Dallas MJ, Lewis KD, Sow SO, Rivers SB, Levine MM, Laserson KF, Feikin DR, Victor JC, Ciarlet M, Neuzil KM, Steele AD. Secondary efficacy endpoints of the pentavalent rotavirus vaccine against gastroenteritis in sub-Saharan Africa. *Vaccine*. 2012;30 Suppl 1:A79-85.

Tate JE, Burton AH, Boschi-Pinto C, Steele AD, Duque J, Parashar UD; WHO-coordinated Global Rotavirus Surveillance Network. 2008 estimate of worldwide rotavirus-associated mortality in children younger than 5 years before the introduction of universal rotavirus vaccination programmes: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2012;12(2):136-41

Tate JE, Panozzo CA, Payne DC, Patel MM, Cortese MM, Fowlkes AL, Parashar UD. Decline and change in seasonality of US rotavirus activity after the introduction of rotavirus vaccine. *Pediatrics*. 2009;124(2):465-71.

Tate JE, Mutuc JD, Panozzo CA, Payne DC, Cortese MM, Cortes JE, Yen C, Esposito DH, Lopman BA, Patel MM, Parashar UD. Sustained decline in rotavirus detections in the United States following the introduction of rotavirus vaccine in 2006. *Pediatr Infect Dis J*. 2011;30(1 Suppl):S30-4.

Teixeira JMS, Camara GNNL, Pimentel PFV, Ferreira MNR, Ferreira MSR, Alfieri AA, Gentsch JR, Leite JPG. Human group C rotavirus in children with diarrhea in the Federal District, Brazil. *Braz J Med Biol Res*. 1998;31(11):1397-403.

Teodoroff TA, Tsunemitsu H, Okamoto K, Katsuda K, Kohmoto M, Kawashima K, Nakagomi T, Nakagomi O. Predominance of porcine rotavirus G9 in Japanese piglets with diarrhea: close relationship of their VP7 genes with those of recent human G9 strains. *J Clin Microbiol*. 2005;43(3):1377-84.

Terrett LA, Saif LJ, Theil KW, Kohler EM. Physicochemical characterization of porcine pararotavirus and detection of virus and viral antibodies using cell culture immunofluorescence. *J Clin Microbiol*. 1987;25(2):268-72.

Theil KW, Lance SE, McCloskey CM. Rotaviruses associated with neonatal lamb diarrhea in two Wyoming shed-lambing operations. *J Vet Diagn Invest.* 1996;8(2):245-8.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 1994;22(22):4673-80.

Tiku VR, Sharma S, Verma A, Kumar P, Raghavendhar S, Aneja S, Paul VK, Bhan MK, Ray P. Rotavirus diversity among diarrheal children in Delhi, India during 2007-2012. *Vaccine.* 2014;32:A62-67.

Timenetsky MCSST, Carmona RCC, Morillo SG, Costa FF, Cilli A, Borges DB, Guiducci R, Eduardo MBP, Katsuya EM. 2004. Surto de Diarréia por Rotavírus. BEPA Boletim Epidemiológico Paulista
http://www.cve.saude.sp.gov.br/agencia/bepa10_biblio.htm.

Timenetsky MC, Gouvea V, Santos N, Alge ME, Kisiellius JJ, Carmona RC. Outbreak of severe gastroenteritis in adults and children associated with type G2 rotavirus. Study Group on Diarrhea of the Instituto Adolfo Lutz. *J Diarrhoeal Dis Res.* 1996;14(2):71-4.

Timenetsky Mdo C, Gouvea V, Santos N, Carmona RC, Hoshino Y. A novel human rotavirus serotype with dual G5-G11 specificity. *J Gen Virol.* 1997;78 (Pt 6):1373-8.

Timenetsky MCST, Kisiellius JJ, Grisi SJFE, Escobar AM, Ueda M, Tanaka H. Rotavirus, adenovirus, astrovirus, calicivirus, and small virus particles in faeces of children with and without diarrhea within the period of 1987 to 1988, in São Paulo. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 1993;35(3):275-80.

Timenetsky Mdo C, Santos N, Gouvea V. Survey of rotavirus G and P types associated with human gastroenteritis in São Paulo, Brazil, from 1986 to 1992. *J Clin Microbiol.* 1994;32(10):2622-4.

Torres-Medina A. Isolation of an atypical rotavirus causing diarrhea in neonatal ferrets. *Lab Anim Sci.* 1987;37(2):167-71.

Trask SD, McDonald SM, Patton JT. Structural insights into the coupling of virion

assembly and rotavirus replication. *Nat Rev Microbiol.* 2012;10(3):165-77.

Trinh QD, Nguyen TA, Phan TG, Khamrin P, Yan H, Hoang PL, Maneekarn N, Li Y, Yagyu F, Okitsu S, Ushijima H. Sequence analysis of the VP7 gene of human human rotavirus G1 in Japan, China, Thailand, and Vietnam in the context of changing distribution of rotavirus G-types. *J Med Virol.* 2007;79(7):1009-16.

Trojnar E, Sachsenröder J, twardziok S, Reetz J, Otto PH, Johne R. Identification of an avian group A rotavirus containing a novel VP4 gene with a close relationship to those of mammalian rotavirus. *J Gen Virol.* 2013;94:136-142.

Tsugawa T, Hoshino Y. Whole genome sequence and phylogenetic analyses reveal human rotavirus G3P[3] strains Ro1845 and HCR3A are examples of direct virion transmission of canine/feline rotaviruses to humans. *Virology.* 2008;380:344-53.

Tsunemitsu H, Jiang B, Saif LJ. Detection of group C rotavirus antigens and antibodies in animals and humans by enzyme-linked immunosorbent assays. *J Clin Microbiol.* 1992a;30(8):2129-34.

Tsunemitsu H, Jiang B, Saif LJ. Sequence comparison of the VP7 gene encoding the outer capsid glycoprotein among animal and human group C rotaviruses. *Arch Virol.* 1996;141(3-4):705-13.

Tsunemitsu H, Jiang B, Yamashita Y, Oseto M, Ushijima H, Saif LJ. Evidence of serologic diversity within group C rotaviruses. *J Clin Microbiol.* 1992b;30(11):3009-12.

Tsunemitsu H, Imagawa H, Togo M, Shouji T, Kawashima K, Horino R, Imai K, Nishimori T, Takagi M, Higuchi T. Predominance of G3B and G14 equine group A rotaviruses of a single VP4 serotype in Japan. *Arch Virol.* 2001;146(10):1949-62.

Tsunemitsu H, Saif LJ, Jiang BM, 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). *J Clin Microbiol.* 1991;29(11):2609-13.

Tupler T, Levy JK, Sabshin SJ, Tucker SJ, Greiner EC, Leutenegger CM. Enteropathogens identified in dogs entering a Florida animal shelter with normal feces or diarrhea. *J Am Vet Med Assoc.* 2012;241(3):338-43.

Turcios RM, Aaron T, Curns MPH, Holman RC, Pandya-Smith I, LaMonte A, et al. Temporal and geographic trends of rotavirus activity in the United States, 1997-2004. *Pediatr Infect Dis J* 2006;25(5):451-4.

Urbina D, Rodríguez JG, Arzuza O, Parra E, Young G, Castro R, del-Portillo P. G and P genotypes of rotavirus circulating among children with diarrhea in the Colombian northern coast. *Int Microbiol.* 2004;7(2):113-20.

Ursu K, Kisfali P, Rigó D, Ivanics E, Erdélyi K, Dán A, Melegh B, Martella V, Bányai K. Molecular analysis of the VP7 gene of pheasant rotaviruses identifies a new genotype, designated G23. *Arch Virol.* 2009;154(8):1365-9.

Van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, Cartens EB, Estes MK, Lemon SM, Maniloff J, Mayo MA, McGeoch DJ, Pringle CR, Wickner RB, Ball, LA. The universal taxonomy of viruses in theory and practice. In: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA, editors. *Virus Taxonomy: Eight Report of the International Committee on taxonomy of Viruses.* Elsevier, Academic Press; Amsterdam, Holland: 2005. p. 3-8.

Varshney B, Jagannath MR, Vethanayagam RR, Kodhandharaman S, Jagannath HV, Gowda K, Singh DK, Rao CD. Prevalence of, and antigenic variation in, serotype G10 rotaviruses and detection of serotype G3 strains in diarrheic calves: implications for the origin of G10P11 or P11 type reassortant asymptomatic strains in newborn children in India. *Arch Virol.* 2002;147(1):143-65.

Velázquez FR, Matson DO, Calva JJ, Guerrero L, Morrow AL, Carter-Campbell S, Glass RI, Estes MK, Pickering LK, Ruiz-Palacios GM. Rotavirus infections in infants as protection against subsequent infections. *N Engl J Med.* 1996;335(14):1022-8.

Venkataram BV, Crawford S, Lawton JA, Pesavento J, Hardy M, Estes MK. Structural studies on gastroenteritis viruses. In: *Gastroenteritis viruses*, edited by D, Chadwick and J A Goode, Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 2001. p. 26-46.

Venkataram BV, Estes MK. Molecular basis on rotavirus replication. In: Chiu W, Burnett RM, Garcea RL. *Structural biology of viruses.* 1st ed Oxford: Oxford University Press, 1997. p. 239-68.

Vesikari T, Isolauri E, D'Hondt E, Delem A, André FE, Zissis G. Protection of infants against rotavirus diarrhoea by RIT 4237 attenuated bovine rotavirus strain vaccine. *Lancet*. 1984;1(8384):977-81.

Victora CG, Olinto MT, Barros FC, Nobre LC. Falling diarrhoea mortality in Northeastern Brazil: did ORT play a role? *Health Policy Plan*. 1996;11(2):132-41.

Villarreal LYB, Uliana G, Valenzuela C, Chacon JLV, Saidenberg ABS, Sanches AA, Brandao PE, Jerez JA, Ferreira AJP. Rotavirus detection and isolation from chickens with or without symptoms. *Rev Bras Ciencia Avicola*. 2006;8:187-191.

Vollet JJ 3rd, DuPont HL, Pickering LK. Nonenteric sources of rotavirus in acute diarrhea. *J Infect Dis*. 1981;144(5):495.

Volotão EM, Soares CC, Maranhão AG, Rocha LN, Hoshino Y, Santos N. Rotavirus surveillance in the city of Rio de Janeiro-Brazil during 2000-2004: detection of unusual strains with G8P[4] or G10P[9] specificities. *J Med Virol*. 2006;78(2):263-72.

Yamamoto D, Ghosh S, Kuzuya M, Wang YH, 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. *J Gen Virol*. 2011;92(Pt 2):361-9.

Yason CV, Schat KA. Pathogenesis of rotavirus infection in various age groups of chickens and turkeys: clinical signs and virology. *Am J Vet Res*. 1987;48(6):977-83.

Yolken RH, Losonsky GA, Vonderfecht S, Leister F, Wee SB. Antibody to human rotavirus in cow's milk. *N Engl J Med*. 1985;312(10):605-10.

Wakuda M, Ide T, Sasaki J, Komoto S, Ishii J, Sanekata T, Taniguchi K. Porcine rotavirus closely related to novel group of human rotaviruses. *Emerg Infect Dis*. 2011;17(8):1491-3.

Waldman EA, Barata RCB, Moraes JC, Guibu IA, Timenetsky MCST. Gastroenterites e infecções respiratórias agudas em crianças menores de 5 anos, em área da Região Sudeste do Brasil, 1986-1987. II–Diarréias. *Rev Saude Publica*. 1997;31(1):62-70.

Wang S, Sundaram JP, Spiro D. VIGOR, an annotation program for small viral genomes. *BMC Bioinformatics*. 2010;11:451.

Wani SA, Bhat MA, Ishaq SM, Ashrafi MA, Buchh AS, Haq M. Detection of a

mammalian-like group A rotavirus in diarrhoeic chicken. *Vet Microbiol.* 2003;94(1):13-8.

Wani SA, Bhat MA, Nawchoo R, Munshi ZH, Bach AS. Evidence of rotavirus associated with neonatal lamb diarrhoea in India. *Trop Anim Health Prod.* 2004;36(1):27-32.

Ward RL. Mechanisms of protection against rotavirus in humans and mice. *J Infect Dis.* 1996;174 Suppl 1:S51-8.

Ward RL, Ashley CS. Comparative study on the mechanisms of rotavirus inactivation by sodium dodecyl sulfate and ethylenediaminetetraacetate. *Appl Environ Microbiol.* 1980;39(6):1148-53.

Ward RL, McNeal MM, Steele AD. Why does the world need another rotavirus vaccine? *Ther Clin Risk Manag.* 2008;4(1):49-63.

Ward RL, Kapikian AZ, Goldberg KM, Knowlton DR, Watson MW, Rappaport R. Serum rotavirus neutralizing-antibody titers compared by plaque reduction and enzyme-linked immunosorbent assay-based neutralization assays. *J Clin Microbiol.* 1996;34(4):983-5.

Ward RL, Kirkwood CD, Sander DS, Smith VE, Shao M, Bean JA, Sack DA, Bernstein DI. Reductions in cross-neutralizing antibody responses in infants after attenuation of the human rotavirus vaccine candidate 89-12. *J Infect Dis.* 2006;194(12):1729-36.

Ward RL, Knowlton DR, Pierce MJ. Efficiency of human rotavirus propagation in cell culture. *J Clin Microbiol.* 1984;19(6):748-53.

Watanabe T, Ohta C, Shirahata T, Goto H, Tsunoda N, Tagami M, Akita H. Preventive administration of bovine colostrum immunoglobulins for foal diarrhea with rotavirus. *J Vet Med Sci.* 1993;55(6):1039-40.

Welch AB. Purification, morphology and partial characterization of a reovirus-like agent associated with neonatal calf diarrhea. *Can J Comp Med.* 1971;35(3):195-202.

White RG, Mebus CA, Twiehaus MJ. Incidence of herds infected with a neonatal calf diarrhea virus (NCDV). *Vet Med Small Anim Clin.* 1970;65(5):487-90.

WHO. Global rotavirus information and surveillance bulletin. Reporting period: January through December 2010. World Health Organization. 2011 (4).

WHO. Rotavirus vaccines:an update. *Wkly Epidemiol Rec*. 2009;84(50):533-40.

WHO. Meeting of the immunization Strategic Advisory Group of Experts, April 2009—conclusions and recommendations. *Wkly Epidemiol Rec* 2009;84:220–36.

Widdowson MA, Steele D, Vojdani J, Wecker J, Parashar U. Global rotavirus surveillance: determining the need and measuring the impact of rotavirus vaccines. *J Infect Dis* 2009;200(Suppl 1):S1–8.

Will LA, Paul PS, Proescholdt TA, Aktar SN, Flaming KP, Janke BH, Sacks J, Lyoo YS, Hill HT, Hoffman LJ, Wu LL. Evaluation of rotavirus infection and diarrhea in Iowa commercial pigs based on an epidemiologic study of a population represented by diagnostic laboratory cases. *J Vet Diagn Invest*. 1994;6(4):416-22

Wilkins C, Gale M Jr. Recognition of viruses by cytoplasmic sensors. *Curr Opin Immunol*. 2010;22(1):41-7.

Wise AG, Smedley RC, Kiupel M, Maes RK. Detection of group C rotavirus in juvenile ferrets (*Mustela putorius furo*) with diarrhea by reverse transcription polymerase chain reaction: sequencing and analysis of the complete coding region of the VP6 gene. *Vet Pathol*. 2009;46(5):985-91.

Woode GN, Crouch CF. Naturally occurring and experimentally induced rotaviral infections of domestic and laboratory animals. *J Am Vet Med Assoc*. 1978;173(5 Pt 2):522-6.

Wu FT, Bányai K, Lin JS, Wu HS, Hsiung CA, Huang YC, Hwang KP, Jiang B, Gentsch JR. Putative canine origin of rotavirus strain detected in a child with diarrhea, Taiwan. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2012;12(2):170-3.

Wu H, Taniguchi K, Urasawa T, Urasawa S. Serological and genomic characterization of human rotaviruses detected in China. *J Med Virol*. 1998;55(2):168-76.

Zeller M, Patton JT, Heylen E, De Coster S, Ciarlet M, Van Ranst M, Matthijnssens J.

Genetic analyses reveal differences in the VP7 and VP4 antigenic epitopes between human rotaviruses circulating in Belgium and rotaviruses in Rotarix and RotaTeq. *J Clin Microbiol.* 2012;50(3):966-76.

Zeng CQ, Labbé M, Cohen J, Prasad BV, Chen D, Ramig RF, Estes MK. Characterization of rotavirus VP2 particles. *Virology.* 1994;201(1):55-65.

Zheng BJ, Chang RX, Ma GZ, Xie JM, Liu Q, Liang XR, Ng MH. Rotavirus infection of the oropharynx and respiratory tract in young children. *J Med Virol.* 1991;34(1):29-37.

Zuccotti G, Meneghin F, Dilillo D, Romanò L, Bottone R, Mantegazza C, Giacchino R, Besana R, Ricciardi G, Sterpa A, Altamura N, Andreotti M, Montrasio G, Macchi L, Pavan A, Paladini S, Zanetti A, Radaelli G. Epidemiological and clinical features of rotavirus among children younger than 5 years of age hospitalized with acute gastroenteritis in Northern Italy. *BMC Infect Dis.* 2010;10:218.

ANEXOS

Siglas de países (Anexo 1)

Afeganistão - AFG	Brasil - BRA
Albânia - ALB	Brunei Darussalam - BRU
Alemanha - GER	Bulgária - BUL
Algéria - ALG	Burkina Fasso – BUR
Andorra - AND	Burma - BIR
Angola - ANG	Burundi - BDI
Anguilla - AIA	Butão - BHU
Antártida - ATA	Cabo Verde - CPV
Antígua e Barbuda - ANT	Camarões - CMR
Antilhas Holandesas - AHO	Camboja - CAM
Arábia Saudita - KSA	Canadá - CAN
Argentina - ARG	Cazaquistão - KAZ
Armênia - ARM	Chade - CHA
Aruba - ARU	Chile - CHI
Austrália - AUS	China - CHN
Áustria - AUT	Chipre - CYP
Azerbaijão - AZE	Cingapura - SIN
Bahamas - BAH	Colômbia - COL
Bahrain - BRN	Comoros - COM
Bangladesh - BAN	Congo - CGO
Barbados - BAR	Costa do Marfim - CIV
Bielorrússia - BRL	Costa Rica - CRC
Bélgica - BEL	Croácia - CRO
Belarus - BLR	Cuba - CUB
Belize - BIZ	Dinamarca - DEN
Benin - BEN	Djibouti - DJI
Bermudas – BER	Dominica - DMA
Bohemia - BOH	Egito - EGY
Bolívia - BOL	El Salvador - ESA
Bósnia-Herzegovina - BIH	Emirados Árabes Unidos - UAE
Botswana - BOT	Equador - ECU

Eritreia - ERI	Honduras – HON
Escócia - SCO	Hong Kong - HKG
Eslováquia - SVK	Hungria - HUN
Eslovênia - SLO	Iêmen - YEM
Espanha – ESP	Ilha Bouvet (Território da Noruega) - BVT
Estados Federados da Micronésia - FSM	Ilha do Homem - IMN
Estados Unidos da América - USA	Ilha Natal - CXR
Estônia - EST	Ilha Pitcairn - PCN
Etiópia - ETH	Ilha Reunião - REU
Federação Russa - RUS	Ilhas Aland - ALA
Fiji - FIJ	Ilhas Cayman - CAY
Filipinas - PHI	Ilhas Cocos - CCK
Finlândia - FIN	Ilhas Comores - COM
França - FRA	Ilhas Cook - COK
Gabão - GAB	Ilhas Faroës - FAR
Gâmbia - GAM	Ilhas Falkland (Malvinas) - FLK
Ghana - GHA	Ilhas Geórgia do Sul e Sandwich do Sul - SGS
Geórgia - GEO	Ilhas Heard e McDonald (Território da Austrália) - HMD
Gibraltar - GIB	Ilhas Marianas do Norte - NMA
Granada - GRN	Ilhas Marshall - MSH
Grécia - GRE	Ilhas Menores dos Estados Unidos - UMI
Groelândia - GRL	Ilhas Norfolk - NFI
Guadalupe - GLP	Ilhas Solomão - SOL
Guam (Território dos Estados Unidos) - GUM	Ilhas Svalbard e Jan Mayen - SJM
Guatemala - GUA	Ilhas Tokelau - TKL
Guernsey - GGY	Ilhas Turcas e Caicos - TKS
Guiana - GUY	Ilhas Virgens (Estados Unidos) - ISV
Guiana Francesa – GUF	Ilhas Virgens (Reino Unido) - IVB
Guiné - GUI	Ilhas Wallis e Futuna – WLF
Guiné Equatorial - GEQ	Índia - IND
Guiné-Bissau - GBS	Indonésia - INA
Haiti - HAI	Iraque - IRQ
Holanda - NED	Irlanda do Norte - NIR

Islândia - ISL
Israel - ISR
Itália - ITA
Iugoslávia - YUG
Jamaica - JAM
Japão - JPN
Jersey - JEY
Jordânia - JOR
Kênia - KEN
Kiribati - KIR
Kuait - KUW
Laos - LAO
Letônia - LAT
Lesoto - LES
Líbano - LIB
Libéria - LBR
Líbia - LBA
Liechtenstein - LIE
Lituânia - LTU
Luxemburgo - LUX
Macau - MAC
Macedônia - MKD
Madagascar - MAD
Malásia - MAS
Malawi - MAW
Maldivas - MDV
Mali – MLI
Malta - MLT
Marrocos - MAR
Martinica – MRT
Maurícia - MRI
Mauritânia - MTN
Mayotte - MYT
México - MEX
Moçambique - MOZ
Moldávia - MDA
Mônaco - MON
Mongólia - MGL
Montenegro - MNE
Montserrat - MST
Myamar - MYA
Namíbia - NAM
Nauru - NRU
Nepal - NEP
Nicarágua - NCA
Níger - NIG
Nigéria - NGR
Niue - NIU
Noruega - NOR
Nova Caledônia - NCL
Nova Zelândia - NZL
Omã - OMN
País de Gales - WAL
Palau - PLW
Palestina - PLE
Panamá - PAN
Papua-Nova Guiné - PNG
Paquistão - PAK
Paraguai – PAR
Peru - PER
Polinésia Francesa - PYF
Polônia - POL
Porto Rico - PUR
Portugal - POR

Qatar - QAT
Quirguistão - KGZ
Reino Unido - GBR
República Centro-Africana - CAF
República da África do Sul - RSA
República da Coreia (Coreia do Sul) - KOR
República da Irlanda - IRL
República das Seicheles – SEY
República Popular da Coreia (Coreia do Norte) - PRK
República Democrática do Congo - COD
República Dominicana - DOM
República Checa - CZE
República Islâmica do Irã - IRI
Romênia - ROM
Ruanda - RWA
Rússia - RUS
Saara Ocidental - ESH
Samoa Americana – ASA
Samoa Ocidental - SAM
Santa Helena - SHN
Santa Lúcia - LCA
São Bartolomeu - BLM
São Cristóvão e Névis - SKN
São Marino - SMR
São Pedro e Miguel - SPM
São Tomé e Príncipe - STP
São Vicente e Granadinas - VIN
Senegal - SEN
Serra Leoa - SLE
Sérvia - SER
Síria - SYR
Somália - SOM
Sri Lanka - SRI
Suazilândia - SWZ
Sudão - SUD
Suécia - SWE
Suíça - SUI
Suriname - SUR
Tadjiquistão – TJK
Tahiti - TAH
Tailândia - THA
Taiwan - TPE
Tanzânia - TAN
Território Britânico do Oceano Índico - IOT
Territórios do Sul da França - ATF
Territórios Palestinos Ocupados - PSE
Timor Leste - TLS
Togo - TOG
Tonga - TGA
Trinidade e Tobago - TRI
Tunísia - TUN
Turcomenistão - TKM
Turquia - TUR
Tuvalu - TUV
Ucrânia - UKR
Uganda - UGA
Uruguai - URU
Uzbequistão - UZB
Vanuatu - VAN
Vaticano - VAT
Venezuela - VEN
Vietnã - VIE
Zaire - ZAI
Zâmbia - ZMB
Zimbábue - ZWE

Abreviações dos aminoácidos (Anexo 2)

Nome	Símbolo	Abreviação	Nomenclatura
Glicina ou Glicocola	Gly, Gli	G	Ácido 2-aminoacético ou Ácido 2-amino-etanóico
Alanina	Ala	A	Ácido 2-aminopropiônico ou Ácido 2-amino-propanóico
Leucina	Leu	L	Ácido 2-aminoisocapróico ou Ácido 2-amino-4-metil-pentanóico
Valina	Val	V	Ácido 2-aminovalérico ou Ácido 2-amino-3-metil-butanóico
Isoleucina	Ile	I	Ácido 2-amino-3-metil-n-valérico ou ácido 2-amino-3-metil-pentanóico
Prolina	Pro	P	Ácido pirrolidino-2-carboxílico
Fenilalanina	Phe ou Fen	F	Ácido 2-amino-3-fenil-propionico ou Ácido 2-amino-3-fenil-propanóico
Serina	Ser	S	Ácido 2-amino-3-hidroxi-propionico ou Ácido 2-amino-3-hidroxi-propanóico
Treonina	Thr, The	T	Ácido 2-amino-3-hidroxi-n-butírico
Cisteína	Cys, Cis	C	Ácido 2-bis-(2-amino-propionico)-3-dissulfeto ou Ácido 3-tiol-2-amino-propanóico
Tirosina	Tyr, Tir	Y	Ácido 2-amino-3-(p-hidroxifenil)propionico ou paraidroxifenilalanina
Asparagina	Asn	N	Ácido 2-aminossuccinâmico
Glutamina	Gln	Q	Ácido 2-aminoglutarâmico
Aspartato ou Ácido aspártico	Asp	D	Ácido 2-aminossuccínico ou Ácido 2-amino-butanodióico
Glutamato ou Ácido glutâmico	Glu	E	Ácido 2-aminoglutárico
Arginina	Arg	R	Ácido 2-amino-4-guanidina-n-valérico
Lisina	Lys, Lis	K	Ácido 2,6-diaminocapróico ou Ácido 2, 6-diaminoexanóico
Histidina	His	H	Ácido 2-amino-3-imidazolpropionico
Triptofano	Trp, Tri	W	Ácido 2-amino-3-indolpropionico
Metionina	Met	M	Ácido 2-amino-3-metiltio-n-butírico



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS
INSTITUTO ADOLFO LUTZ



Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos - CEPIAL
Av. Dr. Arnaldo, 355 – Sala 83 - Cerqueira César - 01246-902
Fone: 3068-2859

São Paulo, 24 de novembro de 2009.

Protocolo: 40/2009

Projeto de Pesquisa nº: **CCD-BM 18/09 – Caracterização molecular do rotavírus humano grupo C identificados no Estado de São Paulo.**

Pesquisador Responsável: **Maria do Carmo Timenetsky**

Prezado Pesquisador

O Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz – CEPIAL analisou e deliberou em reunião de novembro de 2009, em concordância com a Resolução CNS 196/96 e suas resoluções complementares, o projeto acima apresentado na categoria **APROVADO**.

Cabe lembrar que em conformidade com a Resolução 196/96 são deveres do pesquisador :

- a) comunicar, imediatamente, qualquer alteração do projeto e só prosseguir com essa alteração depois da manifestação do CEPIAL;
- b) manter sob sua guarda, pelo prazo de 5 anos e em local seguro, os dados da pesquisa contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEPIAL, para o caso de eventual auditoria;
- c) comunicar formalmente ao CEPIAL quando do encerramento deste projeto;
- d) elaborar e apresentar relatórios parciais e finais;
- e) justificar perante o CEPIAL a interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Luz Marina Trujillo

Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos
Instituto Adolfo Lutz - CEPIAL

PROJETO DE PESQUISA

Título: DIVERSIDADE GENÉTICA E AVALIAÇÃO DE UM POSSÍVEL POTENCIAL ZOOINÓTICO DE CEPAS DE ROTAVÍRUS EM ANIMAIS DOMÉSTICOS E SERES HUMANOS COM GASTROENTERITE AGUDA OU NÃO

Área Temática:

Pesquisador: Adriana Luchs

Versão: 1

Instituição: Instituto Adolfo Lutz

CAAÉ: 02755512.7.0000.0059

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Número do Parecer: 50192

Data da Relatoria: 28/06/2012

Apresentação do Projeto:

O projeto está bem elaborado e propõe uma investigação de interesse em saúde pública ao estudar o potencial zoonótico dos rotavírus de animais de estimação. Uma das hipóteses levantadas é que devido à inclusão da vacina monovalente atenuada G1P no calendário oficial de imunização, há possibilidade de favorecer o aumento da circulação de cepas atípicas em humanos. Os autores também levantam a hipótese de haver a possibilidade da geração de vírus quiméricos contendo segmentos genômicos de rotavírus de humanos e de animais. Serão analisadas amostras fecais de animais e humanos sintomáticos ou assintomáticos. O número de amostras a ser coletado, somente de animais, será de 100, e o estudo prevê um mínimo de 30 amostras coletadas de animais e de seu proprietário.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo do projeto é verificar qual o potencial zoonótico de alguns grupos de rotavírus através da análise de amostras de fezes provenientes de humanos que tenham convivência com animais de estimação. Como objetivo secundário, os autores propõem a realização de diagnóstico diferencial com norovírus em amostras negativas para rotavírus.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Trata-se de coleta de fezes humanas e de animais cujo procedimento não apresenta riscos, podendo ser realizado pelo próprio sujeito da pesquisa, ou na Clínica Veterinária que dispõe de local adequado para tal. As amostras serão mantidas à -20°C, e serão recolhidas e transportadas, de forma adequada, pelo pesquisador responsável pelo projeto e ficarão no Núcleo de Doenças Entéricas do IAL.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto apresentado é bastante interessante pois, através dos resultados obtidos, poderá esclarecer ou apontar algumas conexões epidemiológicas entre gastroenterites humanas e de animais, uma vez que não há uma vigilância sistemática da infecção por rotavírus em animais de estimação.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os autores apresentam a Folha de Rosto para Pesquisa com Seres Humanos, preenchida e assinada pelo coordenador do projeto e pela Diretoria do Instituto Adolfo Lutz.

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido é apresentado de maneira clara e detalhada, definindo a forma como será feita a coleta e qual profissional será responsável pela aplicação do TCLE.

É apresentado, também, o parecer final do Conselho Técnico Científico do IAL, aprovando o desenvolvimento do projeto.

Há um acordo de cooperação assinado pela coordenadora do projeto e pela responsável da Clínica Veterinária, na qual serão coletadas as amostras de origem animal.

Recomendações:

Apresentar o parecer de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Adolfo Lutz, se couber esta análise.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto é relevante e apresenta todos os termos necessários para sua condução.

Situação do Parecer:

Aprovado

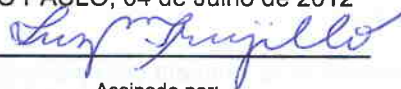
Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Em conformidade com o item IX. 2 da Resolução CNS nº 196/1996 - cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar os relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo, sob sua guarda, por 5 anos, os dados da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar, perante o CEP, interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados. Os relatórios parciais deverão ser encaminhados ao CEPIAL a cada seis meses a partir do início da pesquisa.

SAO PAULO, 04 de Julho de 2012



Assinado por:
Luz Marina Trujillo



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Clinical Virology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jcv

Letter to the Editor

Group C rotavirus, detection in Southeastern Brazil after 15 years

Group C rotavirus (RV-C) was described originally as a cause of diarrhea in pigs and subsequently associated with sporadic cases and outbreaks in humans worldwide.¹ RV-C was detected in different regions of Brazil, however, to the most recent study; no cases had been reported since 1993 in Southeastern,² and 1994 in West-Central Brazil.³

The aim of Acute Diarrheic Disease Monitoring Program (ADDM), with a national extent, is the early detection of diarrhea outbreaks. Stool samples from patients with acute gastroenteritis are sent to the Enteric Virus Laboratory of Adolfo Lutz Institute, macro-regional reference for rotavirus surveillance and a member of ADDM, in order to conduct the viral investigation. Fecal specimens are first tested by a commercial ELISA assay for group A rotavirus (RV-A) detection, the most common rotavirus affecting humans, and the presence of non-group ARV are investigated by PAGE. During 2007 and 2008 surveillance 0.8% (15/1954) samples showed a typical RV-C profile, confirmed by RT-PCR for VP6 gene⁴ and electronic microscopic. So far, no RV-C was detected during 2009 surveillance.

RV-C was detected both in sporadic cases and outbreaks affecting children and adults from countryside areas in São Paulo (SP) and Goiás (GO) States during December 2007 to September 2008. Concomitants RV-A and norovirus (NoV) infections, occurring in some outbreaks, were also observed. However, no co-infection was detected (Table 1).

Incidence and associated disease caused by RV-C remain unclear because sensitive tests for detection are not available to clinical laboratory. Diagnosis is difficult because most ELISA assays do not recognize the RV-C specific antigen VP6. RT-PCR, using RV-C specific primers, is a sensitive and convenient option,¹ however, it has not been widely used due to the large costs for routine surveillance. PAGE analysis of dsRNA requires the presence of at least 10^8 – 10^{10} viral particles/mL for a positive result,¹ nevertheless, this method has been showed sensitive enough to detect RV-C with low costs.

There are several unresolved questions about the ecology of RV-C. The sporadic pattern of detection and the description of localized outbreaks may be interpreted as a spill-over introduction of RV-C strains from an unclear unidentified source or reservoir. Serological investigations suggest higher incidence in rural than in urban populations, a finding that is consistent with transmission from animal sources.⁵ Similar pattern was observed in this study, as the samples were collected from people who live in countryside areas and probably in close contact with domestic animals. Recently, Gabbay et al.⁶ documented the carriage of porcine RV-C in children in Belém, Brazil, and established this virus as another emerging zoonotic infection of humans.

These findings all together suggest that animals can be reservoir of human strains. This provides framework for further surveillance to RV-C that must include better characterization of gene segments of these strains to access its potential origin.

Table 1

Socio-demographic data of patients with acute gastroenteritis in Southeastern and West-Central Brazil with positive RV-C.

Age (years)	Sex	Municipality	State	Month/year	Case	Concomitant infection among other cases in the area
2	M	Ipeúna	SP	December 2007	Sporadic	–
2	M	Catanduva	SP	March 2008	Outbreak	–
7	M	Catanduva	SP	March 2008	Outbreak	–
n.a.	F	Santa Odela	SP	March 2008	Sporadic	–
34	F	Capão Bonito	SP	April 2008	Sporadic	–
7	M	Sales	SP	May 2008	Outbreak	–
36	F	Sales	SP	May 2008	Outbreak	–
26	F	Sales	SP	May 2008	Outbreak	–
24	F	Sales	SP	May 2008	Outbreak	–
6	M	Salto	SP	July 2008	Outbreak	RV-A
54	M	Santa Albertina	SP	August 2008	Outbreak	–
26	M	Santa Albertina	SP	August 2008	Outbreak	–
10	F	Pontalina	SP	August 2008	Sporadic	–
1	F	Mauá	SP	September 2008	Sporadic	–
1	F	Pirineus	GO	September 2008	Outbreak	RV-A/NoV

Conflict of interest

None.

References

1. Castello AA, Arguelles MH, Villegas GA, Lopez N, Ghiringhelli DP, Semorile L, et al. Characterization of human group C rotavirus in Argentina. *J Med Virol* 2000;**62**:199–207.
2. Souza DF, Kisielius JJ, Ueda M, Gabbay YB, Carmona RCC, Timenetsky MCST, et al. An outbreak of group C rotavirus gastroenteritis among adults living in Valentim Gentil, São Paulo State. *Braz J Diarrhoeal Dis Res* 1998;**16**:59–65.
3. Teixeira JMS, Camara GNNL, Pimentel PFV, Ferreira MNR, Ferreira MSR, Alfieri AA, et al. Human group C rotavirus in children with diarrhea in the Federal District. *Braz J Med Biol Res* 1998;**31**:1397–403.
4. Gouvea V, Allen JR, Glass RI, Fang ZY, Bermont M, Cohen J, et al. Detection of group B and C rotaviruses by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1991;**29**:519–23.
5. Bányai K, Jiang B, Bogdán A, Horvath B, Jakab F, Meleg E, et al. Prevalence and molecular characterization of human group C rotaviruses in Hungary. *J Clin Virol* 2008;**37**:317–22.
6. Gabbay YB, Borges AA, Oliveira DS, Linhares AC, Mascarenhas JDP, Barardi CRM, et al. Evidence for zoonotic transmission of group C rotavirus among children in Belem. *Braz J Med Virol* 2008;**80**:1666–74.

Adriana Luchs^{a,*}Simone Guadagnucci Morillo^aJonas José Kisielius^bMarli Ueda^bRita de Cássia Compagnoli Carmona^aMaria do Carmo Sampaio Tavares Timenetsky^a^a Adolfo Lutz Institute, Virology, Enteric Viruses

Laboratory, São Paulo, SP, Brazil

^b Adolfo Lutz Institute, Virology, Electronic Microscopy

Section, São Paulo, SP, Brazil

* Corresponding author at: Instituto Adolfo Lutz, Virologia, 2º andar, Laboratório de Vírus Entéricos, Avenida Dr Arnaldo, nº 355, CEP: 01246-902, São Paulo, SP, Brazil.

Tel.: +55 11 30682909; fax: +55 11 30853505.

E-mail addresses: driluchs@usp.br,driluchs@gmail.com (A. Luchs)

8 August 2009

Monitoring of Group C Rotavirus in Children With Acute Gastroenteritis in Brazil: An Emergent Epidemiological Issue After Rotavirus Vaccine?

Adriana Luchs,^{1*} Simone Guadagnucci Morillo,¹ Cristina Mendes de Oliveira,² and Maria do Carmo Sampaio Tavares Timenetsky^{1*}

¹Enteric Diseases Laboratory, Virology Center, Adolfo Lutz Institute, São Paulo, Brazil

²Virology Laboratory, Tropical Medicine Institute of São Paulo, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

Group C rotavirus (GpCRV) has a worldwide distribution; however, its epidemiology and ecology are still unclear. Evidence for a possible zoonotic role has been postulated recently for Brazilian children strains. The aim of this study was to monitor GpCRV in children ≤ 15 years with acute gastroenteritis during the 2007–2010 national Brazilian rotavirus surveillance, and to undertake the molecular characterization of the major VP6 capsid protein. A total of 3,019 fecal samples were first screened for Group A rotavirus (GpARV). A total of 2,205 GpARV ELISA negative samples were tested further for the presence of GpCRV by SDS-PAGE, electronic microscopy, and RT-PCR for the VP6 gene. The genetic diversity of GpCRV was carried out by sequencing the VP6 gene. GpARV and GpCRV infections were detected in 24.6% (742/3,019) and 0.3% (8/3,019), respectively. The GpCRV detection rate increased from 0.2% (1/422) in 2007 to 1% (7/708) in 2008, and GpCRV cases were not detected in 2009 and 2010. The phylogenetic analysis indicated that the strains belonged to the human lineage, and showed a genetic relationship with the GpCRV strain from Japan isolated in 2009. None of the study sequences was related closely to animal GpCRV strains. This study provides further evidence that GpCRV is a minor cause of acute childhood gastroenteritis in Brazil, and does not suggest that GpCRV may assume epidemiological importance in the future, even after the introduction of a GpARV vaccine. In addition, the molecular analyses of the GpCRV samples in this study do not support the zoonotic hypothesis. **J. Med. Virol. 83:1631–1636, 2011.** © 2011 Wiley-Liss, Inc.

KEY WORDS: rotavirus group C; Brazil; gastroenteritis; phylogenetic analysis; VP6 gene

INTRODUCTION

The Group C rotavirus (GpCRV) was first detected from piglets in 1980 [Saif et al., 1980] and confirmed later as a human pathogen by Bridger et al. [1986]. Since then, GpCRV have been detected from both sporadic episodes and outbreaks of gastroenteritis throughout the world [Cunliffe et al., 2001; Phan et al., 2004; Schnagl et al., 2004; Steyer et al., 2006; Abid et al., 2007]. The GpCRV infection in Brazil was first detected in the city of Rio de Janeiro by Pereira et al. [1983]. Thereafter, the GpCRV infections have been identified sporadically or as outbreaks at various times and locations [Gabbay et al., 1989, 1999; Timenetsky et al., 1993; Souza et al., 1998; Teixeira et al., 1998].

There are several unresolved questions about the ecology of the GpCRV. Its epidemiology has not been described fully due to the lack of samples, sensitive diagnostic assays [Castello et al., 2000], and the sporadic pattern of detection. The description of localized outbreaks may be interpreted as a spillover introduction of GpCRV strains from an unidentified source or reservoir [Bányai et al., 2006; Luchs et al., 2009]. A possible zoonotic role has been postulated based on the elevated GpCRV seroprevalence rates in human populations living in rural settings [Iturriza-Gómara et al., 2004]. In fact, Gabbay et al. [2008] documented the carriage of porcine GpCRV in children in Belém, Brazil, and established this virus as another emerging

Grant sponsor: Graduate Program in Science, Coordinator for Disease Control, Ministry of Health-PPG-CCD-SES/SP (partial support).

Conflict of interest: none declared.

*Correspondence to: Adriana Luchs and Maria do Carmo Sampaio Tavares Timenetsky, Av Dr Arnaldo, n° 355, Centro de Virologia, Cerqueira César, CEP 01246-902 São Paulo, SP, Brazil. E-mail: driluchs@gmail.com; m.timenetsky@gmail.com

Accepted 9 May 2011

DOI 10.1002/jmv.22140

Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

zoonotic infection in humans. The possibility of zoonotic spread of GpCRV has also been considered based on the results of a seroepidemiological survey conducted in the United Kingdom in which the prevalence of antibodies was higher in rural population than in urban population [Iturriza-Gómara et al., 2004].

The GpCRV was detected both in sporadic cases and outbreaks affecting adults and children from rural areas in the states of São Paulo (SP) and Goiás (GO) during the 2007–2008 national Brazilian rotavirus surveillance [Luchs et al., 2009]. This was the first report of GpCRV detection in Southeastern Brazil in over 15-year period of monitoring, however, no genetic information was described in the report. It seems important to improve the GpCRV laboratory surveillance system, especially after 2006 when the RIX4414 rotavirus vaccine was included in the Brazilian Immunization Program, preventing severe rotavirus gastroenteritis, and inducing significant reduction in the frequency of Group A rotavirus (GpARV) detection in children with gastroenteritis [Gurgel et al., 2008]. In the future, the GpCRV may assume an epidemiological importance.

The aim of this study was to intensify the monitoring of GpCRV detection in fecal samples from children <15 years with acute gastroenteritis during the 2007–2010 national rotavirus surveillance. In addition undertake the molecular characterization of the major capsid protein (VP6) of the GpCRV strains detected from children during this period, in order to obtain further information on the genetic relationships between human and animal.

MATERIALS AND METHODS

Samples

The aim of the Acute Diarrhea Disease Monitoring Program (ADDM), with a national range is the early detection of diarrhea outbreaks. Stool samples from patients with acute gastroenteritis are sent to Enteric Diseases Laboratory of the Adolfo Lutz Institute, reference center for rotavirus surveillance and a member of ADDM, in order to conduct the viral investigation. The clinical samples tested in this study were obtained from the following states: São Paulo (SP), Mato Grosso do Sul (MS), Paraná (PR), Tocantins (TO), Goiás (GO), Santa Catarina (SC), and the Brazilian Federal District (DF) (Fig. 1). The samples studied were part of ADDM, acquired from a convenient retrospective sampling, without inclusion or exclusion criteria, with no characterization of the participating health centers, and without patients' clinical evaluation. Therefore, the study may not be representative of the actual epidemiological scenario. This retrospective study was conducted from September 2007 to September 2010 with convenient surveillance specimens collected from children under the age of 15 years presenting with acute gastroenteritis.



Fig. 1. The states highlighted in black collected stool samples from patients with acute gastroenteritis and sent to the Enteric Diseases Laboratory of the Adolfo Lutz Institute, regional reference center for rotavirus surveillance, member of Acute Diarrhea Disease Monitoring Program and its national range.

Detection of Rotaviruses

A total of 3,019 fecal samples were screened first by a commercial ELISA assay (Premier™ Rotaclone®, Meridian Bioscience, Inc., Cincinnati, OH) performed according to the manufacturer's instructions, for the GpARV detection, the most common rotavirus affecting humans. A total of 2,205 GpARV ELISA negative samples were tested further for the presence of GpCRV by polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) according to standard procedures, and confirmed by electronic microscopy (EM).

RNA Extraction and RT-PCR

The GpCRV dsRNA was extracted by QIAamp® Viral RNA Mini kit (Qiagen, Inc., Valencia, CA) according to the manufacturer's instructions, and it was stored at -20°C . RT-PCR protocol and the set of primers (C1, C3, and C4) used to amplify a fragment of the VP6 gene was described by Gouvea et al. [1991]. The expected length for RT-PCR products, synthesized with C1–C4 (nt 994–1349), and C1–C3 (nt 994–1320) pairs were 356 and 327 bp, respectively.

Sequence and Phylogenetic Analysis

The RT-PCR products were purified with Pure-Link™ Purification kit (Invitrogen, Carlsbad, CA). Cycle sequencing was carried out using the BigDye kit v1.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA) with primers C1, C3, and C4 specific for the VP6 gene. Dye-labeled products were run on an automated sequence analyzer (ABI Prism type 3100; Applied

Biosystems). All sequencing chromatograms obtained were edited manually to obtain contigs, using Sequencher 4.7 software. All sequences were screened at the NCBI website using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Sequences generated by manual edition and a set of cognate sequences of human and animal GpCRV, available in the GenBank database, were aligned using Clustal W program [Thompson et al., 1994]. Minor manual adjustments were made to improve the alignment using BioEdit software (Ibis Therapeutics, Carlsbad, CA). Phylogenetic analysis was performed with PAUP4b10 [Swofford et al., 1996]. Neighbor Joining (NJ) and Maximum Likelihood (ML) trees were constructed based on K80 substitution model with a gamma distribution shape parameter, determined by Modeltest v3.7 [Posada and Crandall, 1998]. Bootstrap was assessed using 1,000 replicates. Trees were visualized using Tree View program [Page, 2002].

The genetic distance of the VP6 amino acid sequences were estimated for all the sequences included in this study. Mean genetic distances within and between groups were determined using Mega v4.0 program [Kumar et al., 2001]. Genetic distances were estimated with the Poisson correction model.

Nucleotide Sequences Accession Numbers

The nucleotide sequences determined in this study have been deposited in the GenBank database and assigned the accession numbers HM853819–HM853824.

RESULTS

Detection of Rotaviruses

The GpARV infection was detected in 24.6% (742/3,019) of the samples, being 26% (110/422) in 2007, 30.2% (214/708) in 2008, 2.8% (19/681) in 2009, and 33% (399/1,207) in 2010. The median age for patients infected with the GpARV was 2.4 years old. The GpCRV infection was detected in eight samples: 0.4% of the subset tested (8/2,205) and 0.3% of the overall study (8/3,019). The GpCRV samples were detected in five gastroenteritis outbreaks and three sporadic cases; the median age was 4.5 years old; 75% males (Table I). Concomitants GpARV infections, occurring in some outbreaks, were also observed, however, no co-infection was detected. The GpCRV detection rate

increased from 0.2% (1/422) in 2007 to 1% (7/708) in 2008, and GpCRV cases were not detected in 2009 and 2010.

The seven samples from SP and the one sample from GO showed a similar electrophoretic profile, and the characteristic 4-3-2-2 genomic migration pattern compared with the SA-11 strain of the GpARV dsRNA (data not shown). Electron microscopy analysis revealed both complete rotavirus and damage rotavirus-like particles in samples containing GpCRV.

RT-PCR Amplification and Phylogenetic Analyses of the VP6 Genes

Of the eight GpCRV positive samples, six specimens were amplified successfully by the RT-PCR assay, and their sequences were determined. All the six GpCRV strains (SP22/Hu/BR/2007, SP09/Hu/BR/2008, SP12/Hu/BR/2008, SP28/Hu/BR/2008, SP35/Hu/BR/2008, SP36/Hu/BR/2008) belong to SP and are listed in Table I.

All the GpCRV SP strains were very similar to the GpCRV samples on BLAST search based on the VP6 protein. The phylogenetic analysis indicated that the GpCRV SP strains belonged to the human lineage. None of the GpCRV SP sequences were related closely to animal GpCRV strains (Fig. 2). The GpCRV SP strains were related to each other, since they shared 97–100% amino acid (aa) identities in the VP6 gene.

The GpCRV SP strains analyzed in this study showed a genetic relationship with GpCRV strains from Japan, especially from the city of Yokohama (AB533513) isolated in 2009. The other humans GpCRV Brazilian strains available in GenBank clustered with strains from Nigeria (AF325806), Thailand (EF641110), United Kingdom (M94156, X59843), Spain (AM118018, AM118020), India (AY786570, AY786571, AY795898), and Slovenia (DQ439863). In addition, 12 porcine Korean GpCRV strains were placed on separated branches from the human GpCRV strains, Cowden strain and porcine-like human Brazilian children strains (Fig. 2).

Genetic Distance Analysis

The VP6 amino acid sequences were grouped in bovine GpCRV, porcine GpCRV, human GpCRV, and GpCRV SP samples for the distance analysis. The intragroup distance was 3.2%, for bovine group, 21.9%

TABLE I. Socio-Demographic Data of Positive GpCRV From ≤ 15 Years Old Children With Acute Gastroenteritis in Brazil

Age (years)	Sex	Municipality	State	Month/year	Case	Strains	Accession numbers
2	M	Ipeúna	SP	December 2007	Sporadic	SP22/Hu/BR/2007	HM853819
2	M	Catanduva	SP	March 2008	Outbreak	SP09/Hu/BR/2008	HM853820
7	M	Catanduva	SP	March 2008	Outbreak	SP12/Hu/BR/2008	HM853821
7	M	Sales	SP	May 2008	Outbreak	SP28/Hu/BR/2008	HM853822
6	M	Salto	SP	July 2008	Outbreak	—	—
10	F	Pontalinda	SP	August 2008	Sporadic	SP35/Hu/BR/2008	HM853823
1	F	Mauá	SP	September 2008	Sporadic	SP36/Hu/BR/2008	HM853824
1	M	Pirineus	GO	September 2008	Outbreak	—	—

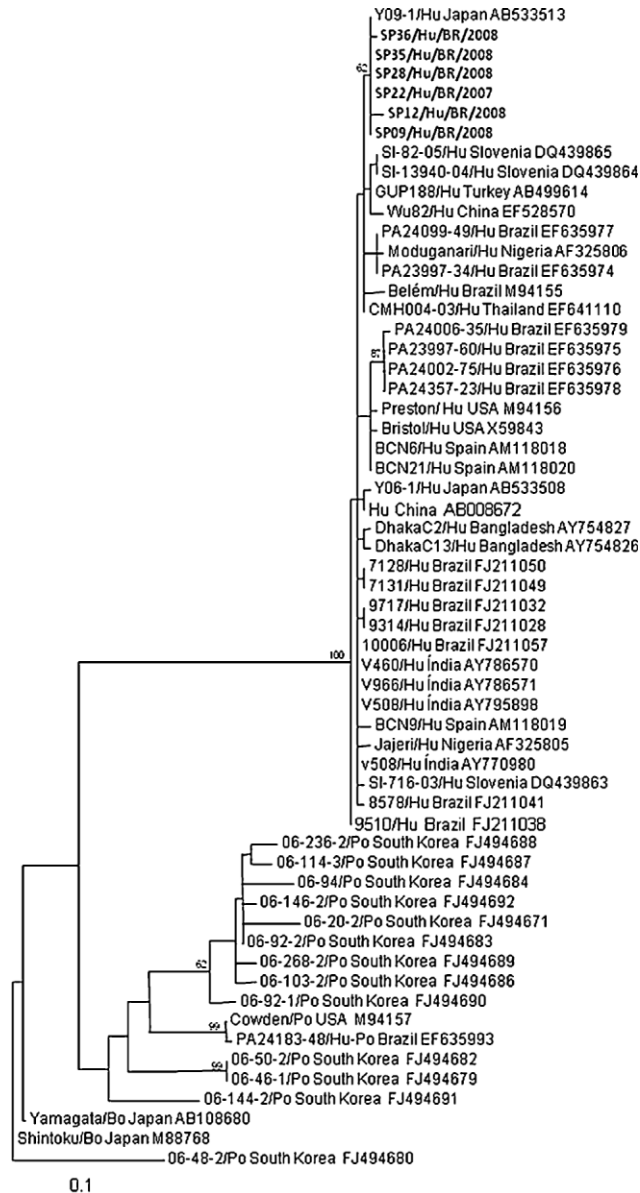


Fig. 2. Maximum Likelihood phylogenetic tree of the partial VP6 nucleotide sequences generated with K80 substitution model plus gamma distribution shape parameter of the six human GpCRV strains isolated in the state of São Paulo. References of the GpCRV strains were obtained from GenBank database. Percentage of bootstrap values greater than 60 are shown at the branch node. The strains isolated from the state of São Paulo are indicated in boldface. The location and accession number of each strain are indicated.

for porcine, 7% for human, and 1.1% for the study samples. Once observed higher distance in the porcine and human groups, another analysis was conducted excluding the prototype porcine Cowden sequence of the porcine group and separating the human sequences in different groups: a group of human sequences from Brazil, a group of human sequences from Japan, and another group for the remaining human sequences.

This newer analysis showed a genetic distance of 21.1% for porcine group, 5% for Brazilian sequences, 6.6% for Japanese, and 4.5% for the remaining human sequences. The higher value of genetic distance obtained in the first analysis for human sequences were possibly due to the presence of the sequences isolated in children from the city of Belém with a possibly porcine origin.

The genetic distance between these latest groups showed that the study sequences have the same genetic distance for bovine (50.1%), porcine Cowden (54.1%), porcine (54.5%), and human porcine-like Belém samples (54.1%). The genetic distance among Japanese samples were 3.8%.

The genetic distance between bovine and porcine group were 29.4%. Among the bovine and the porcine Cowden sequence were 26.2%, similar to the observed between porcine group and porcine Cowden sequence, 26.3%.

DISCUSSION

This study was designed in order to investigate the frequency of GpCRV infection in children ≤ 15 years old with acute gastroenteritis and addressed the genetic relationship of the GpCRV detected with others human, porcine, and bovine strains. The frequency of GpCRV infections detected in this work (0.3%) was similar to that observed in other studies carried out with pediatric population in South Korea (0.7%) [Moon et al., 2011] and Turkey (0.8%) [Mitui et al., 2009]. However, the prevalence of the infection was lower compared to Nigeria (1.8%) [Adah et al., 2002], Argentina (2.8%) [Castello et al., 2002], Spain (16%) [Sánchez-Fauquier et al., 2003], Malawi (3.3%) [Cunliffe et al., 2001], and Japan (1.2%) [Kuzuya et al., 2007]. This study does not suggest that the GpCRV have currently a major epidemiological impact, even after the introduction of a GpARV vaccine. Indeed, the decrease in the detection has fallen to zero in 2009 and 2010.

Considering the GpARV detection, the annual frequency was similar to that reported in studies carried out in Brazil [Linhaires, 2000; Carmona et al., 2006]; however, a low percentage of GpARV infection was observed in 2009. The Brazilian States of Midwest, Southeast, and South regions exhibit a temperate-like climate, with positive GpARV specimens appearing to peak during the winter or dry season (from May to September) [Pereira et al., 1993]. According to the National Meteorology Institute (INMET) records, during the year of 2009, Brazil experienced an atypical raining winter season with higher average rainfall record due to the *El Niño* phenomenon (<http://www.inmet.gov.br>) therefore, this climatic condition could be involved in the low detection frequency observed.

The median age of GpARV and GpCRV detections in the current study were 2.4 and 4.5 years old, respectively, agreeing with seroepidemiological investigations and detection data that suggest a difference

between age distribution in children with diarrhea caused by GpARV, which typically infects children before 3 years of age, and GpCRV, which affects older children [Nilsson et al., 2000; Kuzuya et al., 2001; Iturriza-Gómara et al., 2004; Castello et al., 2009].

Seven of eight GpCRV samples were detected in SP, suggesting that the GpCRV occurs more frequently in this state. However, this may also be an outcome from the efficient health surveillance program conducted in the state, and the higher number of samples sent to laboratory for viral diagnosis. Serological investigations also suggest a higher GpCRV incidence in rural than in urban populations [Iturriza-Gómara et al., 2004; Mukhopadhyaya et al., 2010]. A similar pattern was observed in this study, once the eight samples were collected from people who live in countryside areas. However, there is no serological information about GpCRV from diverse geographical areas in Brazil, and the common source of these infections was unable to be identified during the study.

The high aa identity level of the GpCRV SP strains in the VP6 protein, suggest that these strains were originated from a single or a group of related strains. Also, the partial VP6 gene analyzed showed a relationship between the GpCRV strains from SP and Japan, especially from the city of Yokohama, Kanagawa prefecture. Currently, Brazil is the country with the largest number of Japanese outside Japan, and the Brazilian community in Japan for its part, is the third largest community of foreign workers residing in Japan [Beltrão and Sugahara, 2006]. The fact that this migration flow may lead to a possible exchange of GpCRV strains can be speculated, however, additional analysis of full-length of the VP6 gene, and/or VP7 and VP4 genes are required to fully validate this finding.

The molecular analysis showed that human strains were related distantly to the bovine and porcine strains as observed by Mitui et al. [2009]. The human GpCRV strains appear to constitute a single lineage supported by high bootstrap values, irrespective of the geographic origin. The highly conservation among the human GpCRV genetic sequences could suggest a recent evolution.

In this study, all samples from SP cluster with other human samples and did not show any evidence of animal ancestry. However, the human porcine-like samples from Belém clustered with the prototype porcine Cowden in agreement with the data showed by Gabbay et al. [2008]. There are evidences that the transmission of the GpARV can occur from animal-to-human as well as from animal-to-animal by direct transmission of the virus or the contribution of one or several genes to reassortants [Martella et al., 2006; Ghosh et al., 2007]. Compared to the GpARV, there is a paucity of information regarding the sequence and phylogenetic data on all 11 genomic segments of the GpCRV. Therefore, it is largely unknown whether these genomic segments are totally similar to those of the original species or reassortants from other species.

However, the GpCRV are thought to be able to cause interspecies transmission [Jeong et al., 2009].

In fact, the oldest GpCRV samples were collected from pigs, which strongly suggest that the origin of this pathogen could be porcine. The acquisition of genes with human origin could facilitate the adaptation of such strain in order to infect the human population. The fact that the GpCRV strains do not remain circulating in humans (like GpARV), may suggest that this group does not achieve the fitness required to become a successful human pathogen. An alternative hypothesis is that the GpCRV may cause a subclinical infection in humans. Based on Meleg et al. [2008] study conducted in Hungary, the GpCRV were detected from raw sewage samples, suggesting that the virus is in circulation; however, a significant increase in the number of sporadic cases or outbreaks was not observed.

In conclusion, this study adds further evidence that the GpCRV is a minor cause of acute childhood gastroenteritis in Brazil during the surveillance period. In addition, small-scale of GpCRV outbreaks in restricted communities might occur and go undetected, particularly if the severity of the disease is minor and hospitalization is not required [Bányai et al., 2006]. It is noted that the GpCRV incidence and associated disease remain unclear once sensitive tests for its detection are not available to clinical laboratories. The diagnosis is difficult since most of the ELISA assays do not recognize the GpCRV specific VP6 antigen. The RT-PCR using GpCRV specific primer is a convenient option [Castello et al., 2000]; however, it has not been used widely due to the large costs for routine surveillance. The PAGE analysis of dsRNA requires the presence of 10^8 – 10^{10} viral particles/ml for a positive result [Castello et al., 2000] nevertheless; this method has sufficient sensitivity to detect GpCRV with low costs.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank João Leandro de Paula Ferreira and João Paulo Gervasio Batista, Retrovirus Laboratory of Adolfo Lutz Institute for their assistance with the sequencing reaction and edition. We thank Marli Ueda and Jonas José Kisielius, Electronic Microscopy Laboratory of Adolfo Lutz Institute for their assistance with the electronic microscopy analysis. We are especially thankful to Enteric Diseases Laboratory staff, Audrey Cilli for critical comments on the manuscript, Cibele Daniel Ribeiro for technical assistance, Samira Julien Calux for assistance with sample collection, and Rita de Cássia Compagnoli Carmona for laboratory supervision. We thank Camila Buoro Auler for the specialized English language review.

REFERENCES

- Abid I, Guix S, Aouni M, Pintó R, Bosch A. 2007. Detection and characterization of human group C rotavirus in the pediatric population of Barcelona, Spain. *J Clin Virol* 38:78–82.

- Adah MI, Wade A, Oseto M, Kuzuya M, Taniguchi K. 2002. Detection of human group C rotaviruses in Nigeria and sequence analysis of their genes encoding VP4, VP6, and VP7 proteins. *J Med Virol* 66:269–275.
- Bányai K, Jiang B, Bogdán A, Horváth B, Jakab F, Meleg E, Martella V, Magyari L, Melegh B, Szucs G. 2006. Prevalence and molecular characterization of human group C rotaviruses in Hungary. *J Clin Virol* 37:317–322.
- Beltrão KI, Sugahara S. 2006. Permanentemente temporário: Dekasegus brasileiros no Japão. *Rev Bras Estud Popul* 23:61–85.
- Bridger JC, Pedley S, McCrae MA. 1986. Group C rotaviruses in humans. *J Clin Microbiol* 23:760–763.
- Carmona RCC, Timenetsky MCST, Morillo SG, Richtzenhain LJ. 2006. Human rotavirus serotype G9, São Paulo, Brazil, 1996–2003. *Emerg Infect Dis* 12:963–968.
- Castello AA, Arguelles MH, Villegas GA, Lopez N, Ghiringhelli DP, Semorile L, Glikmann G. 2000. Characterization of human group C rotavirus in Argentina. *J Med Virol* 62:199–207.
- Castello AA, Arguelles MH, Villegas GA, Olthoff A, Glikmann G. 2002. Incidence and prevalence of human group C rotavirus infections in Argentina. *J Med Virol* 67:106–112.
- Castello AA, Arguelles MH, Rota RP, Humphrey CD, Olthoff A, Gentsch JR, Glass RI, Glikmann G, Jiang B. 2009. Detection, characterization of human group C rotavirus in Buenos Aires, Argentina, 1997–2003. *J Med Virol* 81:1109–1116.
- Cunliffe NA, Dove W, Jiang B, Thindwa Cert BD, Broadhead RL, Molyneux ME, Hart CA. 2001. Detection of group C rotavirus in children with acute gastroenteritis in Blantyre, Malawi. *Pediatr Infect Dis J* 20:1088–1090.
- Gabbay YB, Borges AA, Oliveira DS, Linhares AC, Mascarenhas JD, Barardi CR, Simões CM, Wang Y, Glass RI, Jiang B. 2008. Evidence for zoonotic transmission of group C rotaviruses among children in Belém, Brazil. *J Med Virol* 80:1666–1674.
- Gabbay YB, Jiang B, Oliveira CS, Mascarenhas JD, Leite JP, Glass RI, Linhares AC. 1999. An outbreak of group C rotavirus gastroenteritis among children attending a day-care centre in Belém, Brazil. *J Diarrhoeal Dis Res* 17:69–74.
- Gabbay YB, Mascarenhas JDP, Linhares AC, Freitas RB. 1989. Atypical rotavirus among children living in Belém, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 84:5–8.
- Ghosh S, Varghese V, Samajdar S, Bhattacharya SK, Kobayashi N, Naik TN. 2007. Evidence for independent segregation of the VP6- and NSP4-encoding genes in porcine group A rotavirus G6P[13] strains. *Arch Virol* 152:423–429.
- Gouvea V, Allen JR, Glass RI, Fang ZY, Bremont M, Cohen J, McCrae MA, Saif LJ, Sinarachatanant P, Caul EO. 1991. Detection of group B and C rotaviruses by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 29:519–523.
- Gurgel RQ, Correia JB, Cuevas LE. 2008. Effect of rotavirus vaccination on circulating virus strains. *Lancet* 371:301–302.
- Iturriza-Gómara M, Clarke I, Desselberger U, Brown D, Thomas D, Gray J. 2004. Seroepidemiology of group C rotavirus infection in England and Wales. *Eur J Epidemiol* 19:589–595.
- Jeong YJ, Park SI, Hosmillo M, Shin DJ, Chun YH, Kim HJ, Kwon HJ, Kang SY, Woo SK, Park SJ, Kim GY, Kang MI, Cho KO. 2009. Detection and molecular characterization of porcine group C rotaviruses in South Korea. *Vet Microbiol* 138:217–224.
- Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB, Nei M. 2001. MEGA2: Molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics* 17:1244–1245.
- Kuzuya M, Fujii R, Hamano M, Nishijima M, Ogura H. 2007. Detection and molecular characterization of human group C rotaviruses in Okayama Prefecture, Japan, between 1986 and 2005. *J Med Virol* 79:1219–1228.
- Kuzuya M, Fujii R, Hamano M, Ohata R, Ogura H, Yamada M. 2001. Seroepidemiology of human group C rotavirus in Japan based on a blocking enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Diagn Lab Immunol* 8:161–165.
- Linhares AC. 2000. Rotavirus infection in Brazil: Epidemiology and challenges for its control. *Cad Saude Publica* 16:629–646.
- Luchs A, Morillo SG, Kisieliuss JJ, Ueda M, Carmona RC, Timenetsky MC. 2009. Group C rotavirus, detection in Southeastern Brazil after 15 years. *J Clin Virol* 46:389–390.
- Martella V, Banyai K, Ciarlet M, Iturriza-Gómara M, Lorusso E, De Grazia S, Arista S, Decaro N, Elia G, Cavalli A, Corrente M, Lavazza A, Baselga R, Buonavoglia C. 2006. Relationships among porcine and human P[6] rotaviruses: Evidence that the different human P[6] lineages have originated from multiple interspecies transmission events. *Virology* 344:509–519.
- Meleg E, Banyai K, Martella V, Jiang B, Kocsis B, Kisfali P, Melegh B, Szucs G. 2008. Detection and quantification of group C rotavirus in communal sewage. *Appl Environ Microbiol* 74:3394–3399.
- Mitui MT, Bozdayi G, Dalgic B, Bostanci I, Nishizono A, Ahmed K. 2009. molecular Characterization of a human group C rotavirus detected first in Turkey. *Virus Genes* 39:157–164.
- Moon S, Humphrey CD, Kim JS, Baek LJ, Song JW, Song KJ, Jiang B. 2011. First detection of Group C rotavirus in children with acute gastroenteritis in South Korea. *Clin Microbiol Infect* 17:244–247.
- Mukhopadhyaya I, Anbu D, Iturriza-Gomara M, Gray JJ, Brown DW, Kavanagh O, Estes MK, Kang G. 2010. Anti-VP6 IgG antibodies against group A and group C rotaviruses in South India. *Epidemiol Infect* 138:442–447.
- Nilsson M, Svenungsson B, Hedlund KO, Uhnö I, Lagergren A, Akre T, Svensson L. 2000. Incidence and genetic diversity of group C rotavirus among adults. *J Infect Dis* 182:678–684.
- Page RD. 2002. Visualizing phylogenetic trees using TreeView. *Curr Protoc Bioinformatics* (Chapter 6: Unit 6.2).
- Pereira HG, Leite JP, Azeredo RS, de Farias V, Suttmoller F. 1983. An atypical rotavirus detected in a child with gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 78:245–250.
- Pereira HG, Linhares AC, Candeias JAN, Glass RI. 1993. National laboratory surveillance of viral agents of gastroenteritis in Brazil. *Bull Pan Am Health Organ* 27:224–233.
- Phan TG, Nishimura S, Okame M, Nguyen TA, Khamrin P, Okitsu S, Maneeakarn N, Ushijima H. 2004. Virus diversity and an outbreak of group C rotavirus among infants and children with diarrhea in Maizuru city, Japan during 2002–2003. *J Med Virol* 74: 173–179.
- Posada D, Crandall KA. 1998. MODELTEST: Testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14:817–818.
- Saif LJ, Bohl EH, Theil KW, Cross RF, House JA. 1980. Rotavirus-like, calicivirus-like, and 23-nm virus-like particles associated with diarrhea in young pigs. *J Clin Microbiol* 12:105–111.
- Sánchez-Fauquier A, Roman E, Colomina J, Wilhelmi I, Glass RI, Jiang B. 2003. First detection of group C rotavirus in children with acute diarrhea in Spain. *Arch Virol* 148:399–404.
- Schnagl RD, Boniface K, Cardwell P, McCarthy D, Ondracek C, Coulson B, Erlich J, Morey F. 2004. Incidence of group C human rotavirus in central Australia and sequence variation of the VP7 and VP4 genes. *J Clin Microbiol* 42:2127–2133.
- Souza DF, Kisieliuss JJ, Ueda M, Gabbay YB, Carmona RCC, Timenetsky MCST, Mascarenhas JD, Takimoto S, Tanaka H. 1998. An outbreak of group c rotavirus gastroenteritis among adults living in Valentim Gentil, São Paulo State, Brazil. *J Diarrhoeal Dis Res* 16:59–65.
- Steyer A, Poljsak-Prijatelj M, Bufon T, Sedmak M, Vidmar L, Mijovski JZ, Marin J. 2006. First detection of group C rotavirus in patients with gastroenteritis in Slovenia. *J Med Virol* 78: 1250–1255.
- Swofford D, Olsen G, Waddell P. 1996. Phylogenetic inference. In: Hills D, editor. *Molecular systematics*. Massachusetts: Sunderland: pp 407–514. The World Conservation Union. <http://www.iucn.org>.
- Teixeira JM, Camara GN, Pimentel PF, Ferreira MN, Ferreira MS, Alfieri AA, Gentsch JR, Leite JP. 1998. Human group C rotavirus in children with diarrhea in the Federal District, Brazil. *Braz J Med Biol Res* 31:1397–1403.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22:4673–4680.
- Timenetsky MCST, Kisieliuss JJ, Grisi SJFE, Escobar AM, Ueda M, Tanaka H. 1993. Rotavirus, adenovirus, astrovirus, calicivirus, and small virus particles in faeces of children with and without diarrhea within the period of 1987 to 1988, in São Paulo. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 35:275–280.



Short communication

Rare G3P[3] rotavirus strain detected in Brazil: Possible human–canine interspecies transmission

Adriana Luchs*, Audrey Cilli, Simone Guadagnucci Morillo, Rita de Cássia Compagnoli Carmona, Maria do Carmo Sampaio Tavares Timenetsky*

Adolfo Lutz Institute, Virology Center, Enteric Diseases Laboratory, São Paulo, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 November 2011

Received in revised form 7 January 2012

Accepted 30 January 2012

Keywords:

G3P[3] genotype

Brazil

Interspecies transmission

Canine

Human

ABSTRACT

Background: An unusual strain of human rotavirus G3P[3] (R2638 strain) was detected from a 1-year-old child patient during the epidemiological survey of rotavirus in the state of São Paulo, Brazil in 2011.

Objective: The aim of this study was to carry out sequence analyses of the two outer capsid proteins (VP4 and VP7) of the R2638 strain detected in order to obtain further information of the genetic relationships between human and animal rotaviruses.

Study design: Rotavirus G3P[3] was detected using a commercial immunoenzymatic assay, SDS-PAGE, and genotyped by RT-PCR. The analysis of the genetic relationship between human and animal rotaviruses was carried out by sequencing the VP7 and VP4 genes.

Results: The VP7 gene of the R2638 strain displayed the highest nucleotide identity to the canine strains A79-10 (96.6%) and CU-1 (96.2%) isolated in USA. The VP4 sequence showed the highest nucleotide identity to P[3] canine rotavirus strain RV52/96 isolated in Italy at 94.1%. Furthermore, the VP4 genes of P[3] strains could be discriminated into two phylogenetically distinct clusters.

Conclusion: The present study reinforces the hypothesis that animal's rotaviruses might be able to cross the species barriers, and the lack of systematic surveillance of rotavirus infection in small animals hinders the ability to establish firm epidemiologic connections. Moreover, in 2006 rotavirus vaccine was included in the Brazilian Immunization Program, and selective vaccine pressure could increase the circulation of uncommon strains. This is the first report of G3P[3] in over 20-year period of monitoring in Brazil.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Background

Group A rotavirus (RVA) is an important etiologic agent of gastroenteritis in humans and animals. RVA usually exhibits host species restriction, however there are a number of atypical RVA strains isolated from humans and animals that share genetic and antigenic features of virus strains from heterologous species,¹ suggesting that interspecies transmission or reassortment between animals and humans viruses can occur.² The two outer capsid proteins, VP4 and VP7, allow classification into P and G genotypes, respectively,¹ and sequence analysis of the genes that code for these proteins are useful for gathering epidemiologic information, and tracing the origin of unusual RVA strains.³ Strains with unusual VP7 and VP4 genes, regarded as animal-like, have been sporadi-

cally identified in humans and acquired epidemiologic relevance in some geographic areas.⁴

The Acute Diarrhea Disease Monitoring Program (ADDMP) in Brazil focuses the early detection of diarrhea outbreaks. Stool samples from patients with acute gastroenteritis are sent to Enteric Diseases Laboratory of the Adolfo Lutz Institute, reference center for RVA surveillance and a member of ADDMP, in order to conduct the viral investigation. On June 2011, an unusual strain of human rotavirus G3P[3] was detected from a 1-year-old child patient during the epidemiological survey in the state of São Paulo. RVA strains with a G3P[3] combination are usually detected in cats and dogs; in contrast, its detection in humans is very uncommon.³

2. Objective

The aim of this study was to carry out sequence analysis of the two outer capsid proteins (VP4 and VP7) of the RVA G3P[3] (R2638 strain) detected in order to obtain further information on the genetic relationship between human and animal RVA.

* Corresponding author at: Instituto Adolfo Lutz, Centro de Virologia, Núcleo de Doenças Entéricas. Av. Dr Arnaldo, n° 355, São Paulo, SP 01246-902, Brazil. Tel.: +55 11 3068 2909; fax: +55 11 3088 3753.

E-mail addresses: driluchs@gmail.com (A. Luchs), timenetsky.m@gmail.com (M.d.C.S.T. Timenetsky).

3. Study design

3.1. Sample

The sample studied was part of ADDMP, collected on June 3, 2011, and acquired by a 1-year old female child with acute gastroenteritis obtained from a day care center located in the city of Guarulhos. Guarulhos is the second largest city in the state of São Paulo located in a suburb area close to the state capital.

3.2. Rotavirus detection

RVA was detected using a commercial immunoenzymatic assay (RIDASCREEN® Rotavirus, R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany), performed according to the manufacturer's instructions. The RVA double-stranded RNA (dsRNA) profiles was analyzed by silver-stained polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE).⁵

3.3. Rotavirus genotyping and sequencing

RVA dsRNA were extracted by QIAamp® Viral RNA Mini kit (Qiagen, Inc., Valencia, CA) following manufacturer's instructions. The reverse transcriptase polymerase chain reactions (RT-PCR) for VP7 and VP4 genes were performed according to the protocol previously described.^{6,7}

The G3P[3] (R2638 strain) PCR amplicons were sequenced using the BigDye™ kit v3.1 (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA) with primers Beg9 and End9 for the VP7 gene; Con2 and Con3 for the VP4 gene. Dye-labeled products were sequenced using an ABI 3130 sequencer (Applied Biosystems, Inc., Foster city, CA, USA). Sequencing chromatograms were edited manually using Sequencher 4.7 software. Sequences were screened at the NCBI website using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Sequences generated by manual edition and a set of cognate sequences of human and animal RVA available in the GenBank database, were aligned using the BioEdit Sequence Alignment Editor (version 7.0.5.2) program. Genetic analysis was performed with MEGA software version 4.0. Neighbor joining (NJ) trees were constructed based on Maximum Composite Likelihood model determined by MEGA software version 4.0.

The nucleotide sequence of VP7 and VP4 of R2638 strain was deposited in GenBank under the accession number JN848803 and JN848804, respectively.

4. Results

The surveillance stool sample R2638 was positive for RVA antigen by ELISA, and exhibited a long profile by PAGE. By RT-PCR genotyping of the VP7 and VP4 genes with panels of primers specific for various human G and P types, the VP7 was characterized as G3 genotype and the VP4 as P[3] genotype.

The comparison of the G3 sequences showed that R2638 strain shares a clade with two human and two canine strains. The VP7 gene of the Brazilian strain displayed the highest nucleotide identity to the two canine strains A79-10 (96.6%) and CU-1 (96.2%), both isolated in USA in 1979 and 1980, respectively. Curiously, the two human RVA strains HCR3A (95.6%) and 6212 (85.8%) were also isolated in USA in 1984 and 2003, respectively (Fig. 1).

The VP4 sequence of R2638 showed the highest identity to P[3] canine RVA strain RV52/96, which was isolated in Italy, at 94.1% on nucleotide level (Fig. 2). In addition, the VP4 genes of P[3] strains could be discriminated into two clusters phylogenetically distinct, designated A and B. Nucleotide sequence of R2638 strain exhibited high identities to cluster A (91.4–94.1%), whereas lower levels

of sequence identities (74.9–75.2%) were found between Brazilian P[3] strain and cluster B.

5. Discussion

Dogs are regarded as vectors of viral, bacterial, or parasitic zoonosis for persons of all ages, however risks for transmission of enteric viruses are almost ignored.³ Interspecies transmission of animal RVA to humans is a major source of strain diversity. Nonetheless, the marked sequence diversity between human and animal RVA indicates that zoonotic transmission of RVA might be an uncommon event.⁸

RVA G3 strains are the only G genotype for which a broad host range has been described: humans, monkeys, rabbits, pigs, birds, cats, dogs, horses, mice, cows, and lambs.¹ Interestingly, R2638 strain showed a closer genetic relationship with G3 from the American continent, both human and canine strains, suggesting that geographical proximity could facilitate such association.

The P[3] RVA genotype has frequently been isolated from animal origins (e.g., goat, monkey, cat, dog, buffalo).¹ The factors that promote interspecies transmission are poorly understood, and it could be possible that close contact between animals and humans may augment these infections.⁹ Previous phylogenetic analysis studies of VP4 gene revealed two major lineages within P[3] genotype,^{1,10,11} corroborating our findings that P[3] genotypes probably have two main lineages.

Currently, only few detections of RVA strains bearing the G3P[3] genotype have been reported in humans: in Israel,¹² USA,^{13,14} Brazil,¹⁵ Thailand,¹ Italy,³ India,¹⁶ and Taiwan.⁸ G3P[3] strains have been detected in different geographic locations, providing evidence that these strains do not appear to be related to a particular setting. In addition, based on the fact that G3P[3] does not remain in circulation in humans, it can be suggested that this strain does not achieve the fitness required to become a successful human pathogen. Interestingly, all G3P[3] infections identified so far have been detected in children, indicating that these age group is more exposed to infection than adults; presumably because of the close interactions between children and pets together with limited hygiene habits characteristic of the age. Alternatives hypothesis are that G3P[3] may cause a subclinical infection in adults or that previous RVA infection could provide some protection against symptoms.¹⁴ Serological investigations of specific G3P[3] RVA antibodies could provide some insight about this issue.

G3P[3] strains analyzed by RNA–RNA hybridization and/or sequence analysis exhibited closely genetic relationship to feline and canine RVA strains.^{3,8,14,17–20} The only exceptions are CMH222 (Thailand), and CR13594 (India) strains which seem to be genetically related to both simian and caprine G3P[3] rotaviruses.^{1,16} The sequence and genetic analysis of the R2638 strain revealed that VP7 and VP4 genes displayed a possible canine origin. Analysis of these two RVA genes from R2638 strain indicate an animal origin, however it is also possible that one or more of its other segments were derived from human RVA strains making it a human–animal reassortant. Genetic characterization of additional genes is necessary to determine the full genetic profile of this strain.

In 2006 an attenuated G1P[8] vaccine was included in Brazilian Immunization Program, preventing severe rotavirus gastroenteritis and inducing significant reduction in the frequency of RVA detection in children with gastroenteritis.²¹ Selective vaccine pressure could increase the circulation of uncommon strains, reduce vaccine effectiveness,¹⁴ and, as a consequence, surveillance of RVA genotypes is critical for evaluating vaccine impact over time. Moreover, last documented G3P[3] infections occurred in the state of São Paulo during a survey of RVA G and P types from 1986 to 1992;¹⁵ and this is the first report in over 20-year period of monitoring.

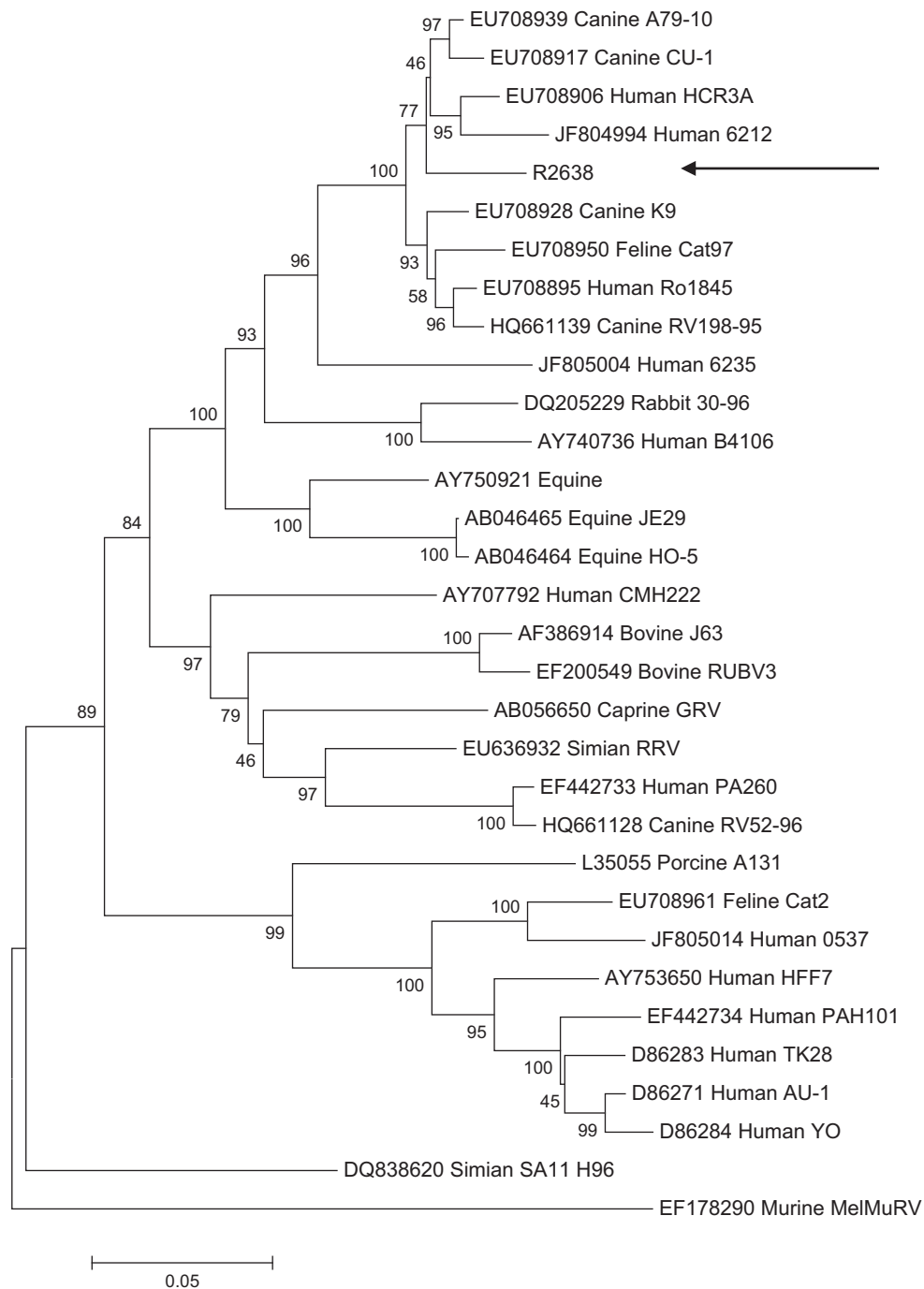


Fig. 1. Neighbor joining phylogenetic tree of the partial VP7 nucleotide sequence generated with MEGA 4.0 software of the R2638 strain isolated from a 1-year-old child patient in the state of São Paulo. Reference of G3 was obtained from GenBank database. Species and accession number of each strain are indicated. The scale indicates the number of divergent nucleotide residues. Percentage of bootstrap values is shown at the branch node.

In addition, the lack of systematic surveillance of RVA infection in small animals (e.g., dogs and cats), and the fact that most RVA infections in such animals may go undetected hinder the ability to establish firm epidemiologic connections.^{3,8} In conclusion, this study reinforces the hypothesis that canine-like rotaviruses may be able to cross the species barriers, demonstrating that molecular genetic analysis is essential for detection of interspecies transmission events, and is also an important tool to understand the global ecology of rotaviruses and its evolution.

Funding

None.

Conflicts of interest

None declared.

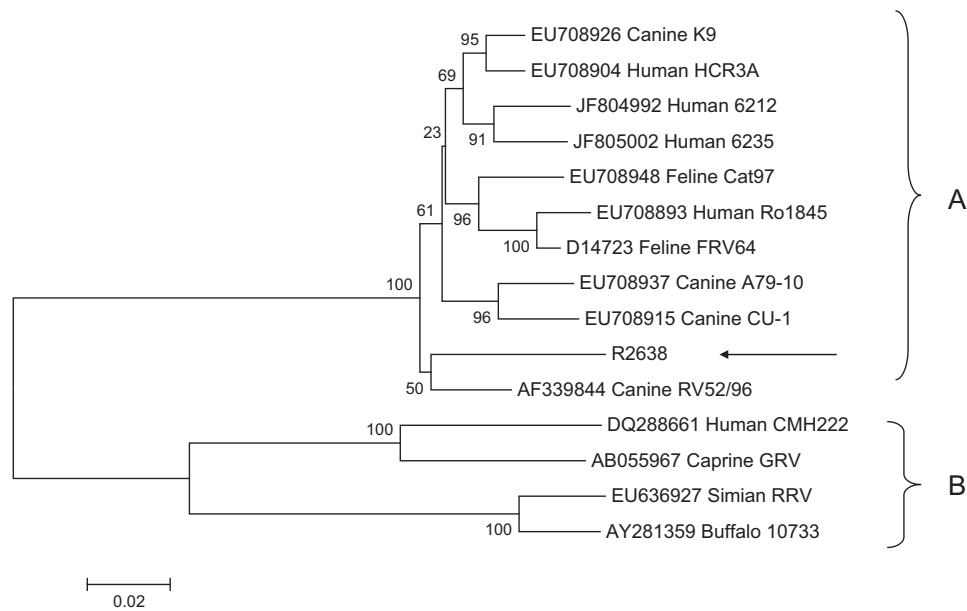


Fig. 2. Neighbor joining phylogenetic tree of the partial VP4 nucleotide sequence generated with MEGA 4.0 software of the R2638 strain isolated from a 1-year-old child patient in the state of São Paulo. Reference P[3] was obtained from GenBank database. Species and accession number of each strain are indicated. The scale indicates the number of divergent nucleotide residues. Percentage of bootstrap values is shown at the branch node.

Ethical approval

Previous ethics committee approval was granted by Adolfo Lutz Institute – São Paulo – Brazil (Ref. 14/05; Ref. 53/05). This was an anonymous unlinked study and informed consent was not required according to the resolution 196/96 concerning research involving human beings – Conselho Nacional de Saúde (CNS)/Ministério da Saúde (MS), Brasília, 1996.

Acknowledgments

We thank Carolina Jeannine Gill, Enteric Diseases Laboratory of Adolfo Lutz Institute for technical assistance with the PAGE assay, and Antônio Erculiani Junior for technical assistance with the sequencing reaction. We thank Luciana Nogueira de Sousa Andrade for critical language review.

References

- Khamrin P, Maneekarn N, Peerakome S, Yagyu F, Okitsu S, Ushijima H. Molecular characterization of a rare G3P[3] human rotavirus reassortant strain reveals evidence for multiple human–animal interspecies transmissions. *J Med Virol* 2006;**78**(7):986–94.
- Kapikian AZ, Hoshino Y, Chanock RM. Rotaviruses. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Martin MA, Lamb RA, Roizman B, et al, editors. *Fields virology*, vol. 2, 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2001. p. 1787–833.
- De Grazia S, Martella V, Giammanco GM, Gómara MI, Ramirez S, Cascio A, et al. Canine-origin G3P[3] rotavirus strain in child with acute gastroenteritis. *Emerg Infect Dis* 2007;**13**(7):1091–3.
- Iturriza-Gómara M, Kang G, Gray J. Rotavirus genotyping: keeping up with an evolving population of human rotaviruses. *J Clin Virol* 2004;**31**(4):259–65.
- Herring AJ, Inglis NF, Ojeh CK, Snodgrass DR, Menzies JD. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. *J Clin Microbiol* 1982;**16**(3):473–7.
- Gouvea V, Glass RI, Woods P, Taniguchi K, Clark HF, Forrester B, et al. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *J Clin Microbiol* 1990;**28**(2):276–82.
- Gentsch JR, Glass RI, Woods P, Gouvea V, Gorziglia M, Flores J, et al. Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992;**30**(6):1365–73.
- Wu FT, Bányai K, Lin JS, Wu HS, Hsiung CA, Huang YC, et al. Putative canine origin of rotavirus strain detected in a child with diarrhea, Taiwan. *Vector Borne Zoonotic Dis* October 24, 2011 [Epub ahead of print].
- Palombo EA. Genetic analysis of Group A rotaviruses: evidence for interspecies transmission of rotavirus genes. *Virus Genes* 2002;**24**(1):11–20.
- Santos N, Clark HF, Hoshino Y, Gouvea V. Relationship among serotype G3P5A rotavirus strains isolated from different host species. *Mol Cell Probes* 1998;**12**:379–86.
- Matthijnsens J, Taraporewala ZF, Yang H, Rao S, Yuan L, Cao D, et al. Simian rotaviruses possess divergent gene constellations that originated from interspecies transmission and reassortment. *J Virol* 2010;**84**(4):2013–26.
- Aboudy Y, Shif I, Zilberstein I, Gotlieb-Stematsky T. Use of polyclonal and monoclonal antibodies and analysis of viral RNA in the detection of unusual group A human rotaviruses. *J Med Virol* 1988;**25**(3):351–9.
- Li B, Clark HF, Gouvea V. Nucleotide sequence of the VP4-encoding gene of an unusual human rotavirus (HCR3). *Virology* 1993;**196**(2):825–30.
- Grant L, Esona M, Gentsch J, Watt J, Reid R, Weatherholtz R, et al. Detection of G3P[3] and G3P[9] rotavirus strains in American Indian children with evidence of gene reassortment between human and animal rotaviruses. *J Med Virol* 2011;**83**(7):1288–99.
- Timenetsky MC, Santos N, Gouvea V. Survey of rotavirus G and P types associated with human gastroenteritis in São Paulo, Brazil, from 1986 to 1992. *J Clin Microbiol* 1994;**32**(10):2622–4.
- Banerjee I, Iturriza-Gómara M, Rajendran P, Primrose B, Ramani S, Gray JJ, et al. Molecular characterization of G11P[25] and G3P[3] human rotavirus strains associated with asymptomatic infection in South India. *J Med Virol* 2007;**79**(11):1768–74.
- Nakagomi O, Ohshima A, Aboudy Y, Shif I, Mochizuki M, Nakagomi T, et al. Molecular identification by RNA–RNA hybridization of a human rotavirus that is closely related to rotaviruses of feline and canine origin. *J Clin Microbiol* 1990;**28**(6):1198–203.
- Santos N, Gouvea V, Timenetsky MC, Clark HF, Riepenhoff-Talty M, Garbarg-Chenon A. Comparative analysis of VP8* sequences from rotaviruses possessing M37-like VP4 recovered from children with and without diarrhoea. *J Gen Virol* 1994;**75**:1775–80.
- Nakagomi O, Nakagomi T. Genomic relationships among rotaviruses recovered from various animal species as revealed by RNA–RNA hybridization assays. *Res Vet Sci* 2002;**73**(3):207–14.
- Tsugawa T, Hoshino Y. Whole genome sequence and phylogenetic analyses reveal human rotavirus G3P[3] strains Ro1845 and HCR3A are examples of direct virion transmission of canine/feline rotaviruses to humans. *Virology* 2008;**380**(2):344–53.
- Gurgel RQ, Correia JB, Cuevas LE. Effect of rotavirus vaccination on circulating virus strains. *Lancet* 2008;**371**:301–2.

Amino Acid Sequence Analysis of the Two Major Outer Capsid Proteins (VP7 and VP4) from Human-Derived Canine G3P[3] Rotavirus Strain Detected in Brazil

Análise da Sequência de Aminoácidos das Duas Principais Proteínas do Capsídeo Externo (VP7 e VP4) de Cepa de Rotavírus Humano Derivado de Cão G3P[3] Detectada no Brasil

Adriana Luchs¹, Maria do Carmo Sampaio Tavares Timenetsky¹

1. Instituto Adolfo Lutz, Centro de Virologia, Núcleo de Doenças Entéricas, São Paulo, SP, Brasil

Abstract

Introduction: A close look at the rotavirus group A (RVA) genotypes in Brazil revealed the detection of a rare G3P[3] strain close related to canine strains. The aim of this study was to add to the already known genetic analysis by the description of the G3P[3] (IAL-R2638 strain) amino acid characteristics. **Methods:** Amino acid sequence analysis and protein based trees were conducted using BioEdit and MEGA 4.0. **Results:** The VP7 and VP4 protein of the IAL-R2638 strain displayed the highest amino acid identity to the canine-derived human strain HCR3A (99.2%), and to the canine strain RV52/96 (96.4%), respectively. IAL-R2638 strain did not possess an extra VP7 N-linked glycosylation site at amino acid 238 recently described for some G3 strains, as well as RotaTeq™ G3 vaccine strain. The topology exhibited by phylogenetic trees in previous analysis were maintained in the present amino acid-based trees, reinforcing a stable relationship between G3P[3] strains. **Conclusions:** Amino acid analysis data were consistent with the previous sequence of data obtained for the IAL-R2638 strain, supporting its possible canine origin. Theoretically, RotaTeq™ vaccine could efficiently protect against G3P[3] infections based on the lack of the extra VP7 N-linked glycosylation site at amino acid 238. Phylogenetic analysis hypothesizes that all features undergo evolution independently of each other; however, unfavorable effects of nucleotide substitutions may be compensated by substitutions in other positions. The present study raises the question as to whether the amino acid-based trees could be applied as an approach to the study of RVA evolution, avoiding incorrect phylogenetic reconstructions.

Keywords: Disease Vectors. Epidemiological Surveillance. Gastroenteritis. Diarrhea. Rotavirus. Reoviridae Infections.

Resumo

Introdução: A vigilância epidemiológica dos rotavírus do grupo A (RVA) no Brasil possibilitou a detecção de cepa rara G3P[3] geneticamente semelhante às cepas caninas. O objetivo do presente estudo foi realizar a análise de aminoácidos da cepa G3P[3] (IAL-R2638) e complementar as informações adquiridas por meio da análise nucleotídica. **Métodos:** A análise da sequência de aminoácidos e a construção das árvores proteicas foi realizada utilizando os programas BioEdit e MEGA 4.0. **Resultados:** As proteínas VP7 e VP4 da cepa IAL-R2638 exibiram maior identidade de aminoácidos com a cepa humana derivada de cão HCR3A (99,2%) e com a cepa canina RV52/96 (96,4%), respectivamente. A cepa IAL-R2638 não apresenta o sítio adicional de glicosilação N na posição 238 na proteína VP7, recentemente descrito em algumas cepas G3, assim como a cepa G3 vacinal da vacina RotaTeq™. As topologias exibidas nas árvores filogenéticas previamente analisadas foram mantidas nas árvores baseadas em aminoácidos, reforçando o parentesco estável entre cepas G3P[3]. **Conclusões:** A análise proteica da cepa IAL-R2638 foi consistente com os dados genéticos obtidos previamente, corroborando sua possível origem canina. Teoricamente, a vacina RotaTeq™ pode ser eficaz contra infecções por G3P[3], uma vez que essas cepas não possuem o sítio extra de glicosilação N 238. Análise filogenética pressupõe que todas as substituições nucleotídicas acarretam evolução de forma independente. Entretanto, substituições desfavoráveis podem ser compensadas por novas substituições em outras posições. O presente trabalho sugere o uso de árvores baseadas em aminoácidos como uma ferramenta auxiliar no estudo da evolução dos RVA, evitando construções filogenéticas incorretas.

Palavras-chave: Vetores de doenças. Vigilância epidemiológica. Gastroenterite. Diarreia. Rotavirus. Infecções por Reoviridae.

Correspondence: Adriana Luchs, Maria do Carmo Sampaio Tavares Timenetsky. Instituto Adolfo Lutz, Centro de Virologia, Núcleo de Doenças Entéricas. Address: Av. Dr. Arnaldo, nº 355, São Paulo, SP, Brasil, 01246-902. Fax: 55-11-3088 3753; phone: 55-11-3068 2909. E-mail: driluchs@gmail.com; timenetsky.m@gmail.com

Conflicts of interest: None declared.

Funding: None.

Ethical Approval: Previous Ethics Committee approval was granted by Adolfo Lutz Institute – São Paulo – Brazil (Ref. 14/05; Ref. 53/05). This was an anonymous unlinked study and informed consent was not required according to the resolution 196/96 concerning research involving humans beings – Conselho Nacional de Saúde (CNS)/Ministério da Saúde (MS), Brasília, 1996.

Received 13 Oct 2013; Revised 14 Nov 2013; Accepted 27 Nov 2013.

INTRODUCTION

Group A rotavirus (RVA) are an important cause of severe gastroenteritis among infants and young children worldwide, as well as in animals of a wide variety of species.¹ RVA is classified into different P and G genotypes based upon the main neutralization antigens, namely, the spike protein (VP4) and the major outer capsid glycoprotein (VP7). The most prevalent genotypes, G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8], and G9P[8], are responsible for approximately 90% of worldwide human RVA infections.² However, RVA epidemiology is constantly changing, mainly due to reassortment events, and interspecies transmission of animal RVA to humans.³

With regard to the high incidence of RVA infections worldwide, two oral live-attenuated vaccines have been licensed. Rotarix™ is a monovalent vaccine derived from a human G1P[8] strain, and has been introduced in Brazilian Immunization Program since 2006.^{4,6} Rotateq™ is a human-bovine reassortant RVA vaccine that contains the human genotypes G1, G2, G3, G4, and P[8],⁶ and is available at private clinics. The post-marketing surveillance of circulating RVA genotypes is crucial for vaccine efficacy studies. In addition, selective vaccine pressure could also increase the circulation of uncommon animal-like strains.⁷ In fact, a close look at RVA genotypes in Brazil has already revealed the detection of uncommon G3P[3] strain with similarity to canine strains in 2012.⁸

Sequence similarities have been used as evidence for evolutionary relationships between strains. However, phylogenetic trees based on the analyses of DNA sequence may be misleading, especially when G+C content differs widely among lineages; therefore protein-based trees from amino acid sequences may be more reliable.^{9,10,11} Moreover; simulations on model proteins have shown that a smaller number of correlated substitutions is enough to change topology of the resulting phylogenetic trees.¹² The aim of this study was to add to the already known genetic analysis by the description of the G3P[3] (IAL-R2638 strain) amino acid characteristics.

MATERIAL AND METHODS

Strain

RVA IAL-R2638 strain (G3P[3]) was isolated from a 1 year old child with gastroenteritis symptoms in São Paulo, Brazil in 2011.⁸ Partial VP7 and VP4 sequences suggested a common origin between this human strain and canine strains.⁸ The amino acid characteristic of IAL-R2638 strain was determined in this study.

RNA extraction and reverse transcription-PCR (RT-PCR)

Viral RNA was extracted using QIAamp® Viral RNA Mini kit (Qiagen, Inc., Valencia, CA) according to the manufacturer's

instructions. RT-PCR for VP7 and VP4 genes was performed according to the protocol previously described.^{13,14}

Nucleotide sequencing

The G3P[3] (IAL-R2638 strain) PCR amplicons were sequenced using the BigDye™ kit v3.1 (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA) with primers Beg9 and End9 for the VP7 gene; Con2 and Con3 for the VP4 gene. Dye-labeled products were sequenced using an ABI 3130 sequencer (Applied Biosystems, Inc., Foster city, CA, USA).

Protein sequence analysis

The sequences obtained for the VP7 and VP4 (accession number JN848803 and JN848804, respectively) genes, and a set of cognate sequences of human and animal RVA available in the GenBank database were assembled with the BioEdit Sequence Alignment Editor (version 7.0.5.2) program. Protein sequence analysis was conducted using BioEdit and MEGA software version 4.0.¹⁵ Amino acid trees were constructed using the neighbor-joining method based on Poisson correction model.

Results

The deduced amino acid sequence of the VP7 gene from human strain IAL-R2638 was determined and compared to those of reference RVA strains belonging to the G3 genotype (Figure 1). The VP7 amino acid sequence of strain IAL-R2638 was 90.5 to 99.2% identical to those of RVA strains exhibiting G3 genotype specificity, and the highest amino acid identity (99.2% and 98.8%) was found to human RVA strain HCR3A (USA) and Ro1845 (Israel), respectively. Strain IAL-R2638 also exhibited high amino acid identity to canine strains A79-10 (98.8%), CU-1 (98.8%), RV198-95 (98.8%), K9 (98.4%), and to feline strain Cat97 (98.8%) (Figure 2). The lowest amino acid identity was observed between strain IAL-R2638 and murine strain MelMuRV (90.5%) (Figure 2).

The VP7 protein of strain IAL-R2638 had a potential N-linked glycosylation site located at amino acid 69 (Asn) (Figure 1). The antigenic regions A-F of strain IAL-R2638 clearly support its classification as genotype G3. Within the VP7 hyper variable regions A-F, the VP7 of human strain IAL-R2638 was completely identical to the canine strains A79-10, CU-1, and RV198-95; to the human strains HCR3A and Ro1845; and to the feline strain Cat97 (Figure 1). VP7 hyper-variable region B (amino acids 87 to 101) seems to be the most conserved region considering all strains analyzed, while region A (amino acid 39 to 50) seems to be the most variable (Figure 1).

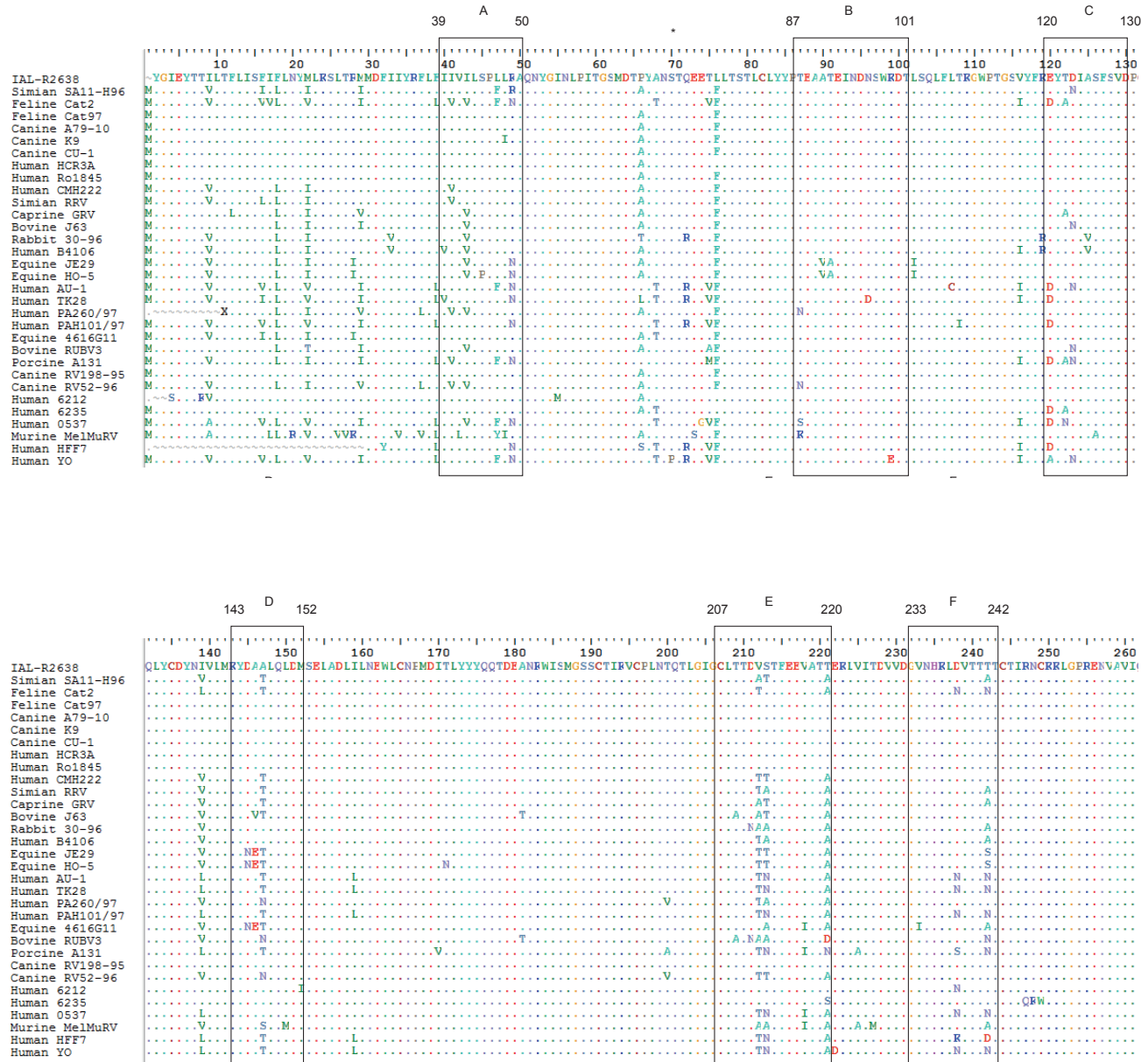


Figure 1 Deduced amino acid sequence of the VP7 protein of human strain IAL-R2638, and of a selection of G3 rotaviruses. The VP7 antigenic regions A-F are indicated. The glycosylation site NST (amino acids 69 to 71) is indicated by asterisks. Species and isolate of each strain are indicated.

The alignment of the deduced amino acid sequences from VP7 gene revealed amino acid substitutions inside the variable region D (amino acids 143 to 152) at position 147^{A>T}; region E (amino acids 207 to 220) at positions 212^{A>V} and 213^{A/T/N>V}; and region F (amino acids 233 to 242) at position 242^{A/N/S>V}. Amino acid substitutions were also observed outside VP7 hyper-variable regions in IAL-R2638 strain: 66^{A>P}, 76^{F>L}, 221^{A>T} and 278^{A>V} (Figure 1).

Among RVA strains with G3 genotype specificity, two distinct VP7 branches or groups were observed in amino acid-based tree, and designated A and B (Figure 2). The Brazilian RVA strain IAL-R2638 clustered into group A, along with human and animal RVA G3 genotypes from different countries, including the reference simian strains RRV (EU636932) and SA11-H96 (DQ838620) both from USA (Figure 2). Group B comprised most of the human G3 strains, excluding the porcine strain A131 (L35055) and the feline strain Cat2 (EU708961) (Figure 2).

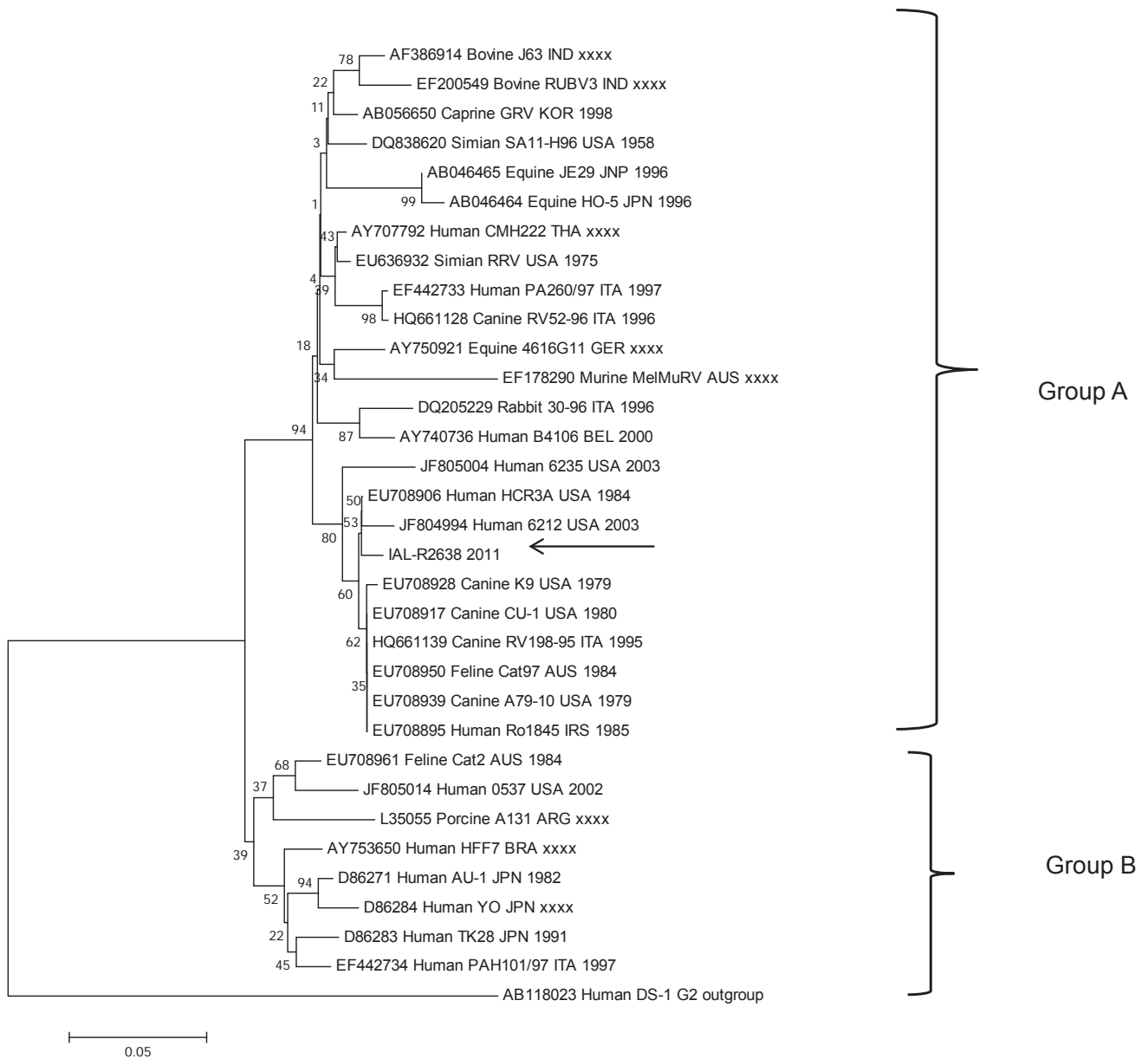


Figure 2 Neighbor-joining tree of the partial VP7 deduced amino acid sequence generate with MEGA 4.0 software of the IAL-R2638 strain (arrow). Reference G3 strains were obtained from GenBank database. Accession number, species, isolates, countries and year of each strain are indicated. Group A and B represent two clusters genetically distinct. The scale indicates the number of divergent amino acid residues. Percentages of bootstrap values are shown at the branch node.

Figure 3 shows the deduced amino acid sequence of the VP4 (subunit VP8*) of the human strain IAL-R2638 and representative VP4 amino acid sequences of RVA P[3] genotype. The potential cleavage sites, arginine (R) at positions 231 and 241, were maintained in strain IAL-R2638. The third arginine at position 247 in strain IAL-R2638 was substituted by a lysine (K). The same substitution was also observed in feline strains Cat97 and FRV64; in canine strains A79-10, K9, CU-1, and RV52/96; and in human strains HCR3A, Ro1845, 6212, and 6235. The highly conserved cysteines (C) at residues 203 and 216, and proline (P) at residues 68, 71, 225 and 226 were maintained in strain IAL-R2638 (Figure 3).

Comparative analysis of the deduced amino acid sequences of the strain IAL-R2638 VP4 fragment (VP8* subunit) showed that the variable region between amino acid 71 and 204 was fairly conserved among all strains analyzed, confirming the classification of strain IAL-R2638 as P[3] genotype. Within the VP8* subunit variable region, a unique and remarkable substitution occurred in strain IAL-R2638 at positions 148^{Q→L} and 149^{N→S} (Figure 3).

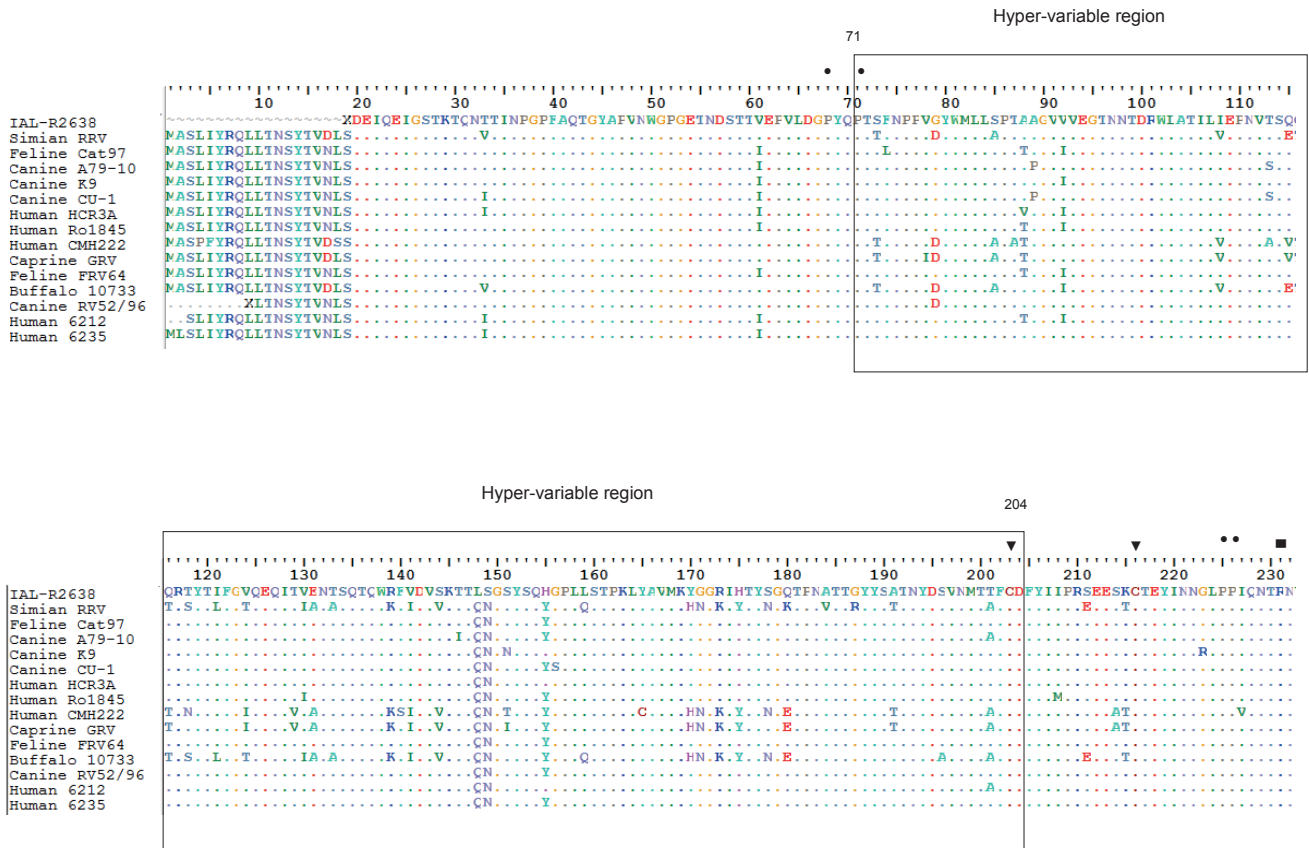


Figure 3 Deduced amino acid sequence of the VP8* trypsin cleavage product of the VP4 protein of human strain IAL-R2638, and of a selection of P[3] rotaviruses. Hyper-variable region (amino acids 71 to 204), the highly conserved cysteine (▼), prolines (●), and arginines (■) are indicated. Species and isolate of each strain are indicated.

Still inside the VP8* variable region, a substitution at residue 155^{V→H} was observed in strain IAL-R2638, which was also shared by strains K9 (canine), HCR3A (human) and 6212 (human). Another two amino acid substitutions inside variable region were observed in strain IAL-R2638: 92^{I→V} and 201^{A→T} (Figure 3). Other amino acid substitutions were observed outside VP8* hyper-variable region in strain IAL-R2638: (i) an inversion in amino acid residues at positions 233^{V→I} and 234^{I→V}, and (ii) amino acid substitution at position 245^{S→P}. This last substitution was shared exclusively with human strain Ro1845 (Figure 3).

The overall amino acid sequence identity between the VP4 gene of strain IAL-R2638 and those

cognate P[3] sequences ranged from 84.2 to 96.8%. The VP4 deduced amino acid sequence of IAL-R2638 showed the highest identity to P[3] canine RVA strain RV52/96 (96.8%). Strain IAL-R2638 also exhibited high amino acid identity to feline strain FRV64 (96.4%), to human strain HCR3A (96.4%), and to canine strain K9 (96.4%). The lowest amino acid identity was observed between strain IAL-R2638 and simian strain RRV (84.2%) (Figure 4). In addition, the VP4 deduced amino acid sequence of P[3] strains could be discriminated into two distinct clusters, designated C and D. The Brazilian RVA strain IAL-R2638 clustered into group C, a part of the reference simian strains RRV (EU636927) (Figure 4).

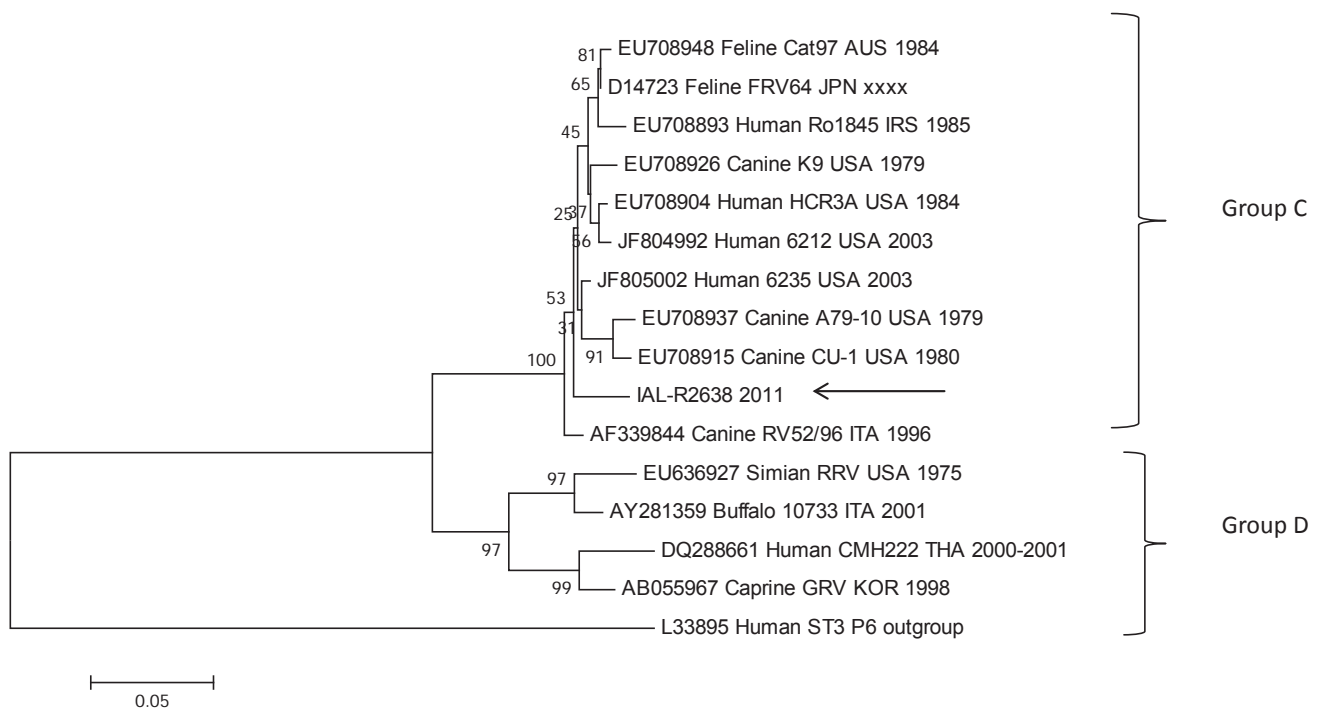


Figure 4 Neighbor-joining tree of the partial VP4 deduced amino acid sequence generate with MEGA 4.0 software of the IAL-R2638 strain (arrow). Reference P[3] strains were obtained from GenBank database. Accession number, species, isolates, countries and year of each strain are indicated. Group C and D represent two clusters genetically distinct. The scale indicates the number of divergent amino acid residues. Percentages of bootstrap values are shown at the branch node.

DISCUSSION

RVA bearing G3P[3] specificities are common in both cats and dogs.¹⁶ However, there also have been few reports describing the detection of G3P[3] strains in humans,^{7,17,18} including in Brazil.^{8,19,20} The detection of G3P[3] in humans was presumably due to the interspecies transmission from animals to humans,¹⁹ and the analysis of these genomes give general insights into the diversity and evolution of the RVA strains.^{3,7,8,17,22,23}

Previous G3P[3] nucleotide analysis studies have demonstrated the existence of a particular canine-feline genogroup comprising animal (i.e. Cat97, CU-1, K9, A79-10) and animal-derived human (i.e. HCR3A, Ro1845) strains^{16,22,23} that were distinct from genomes of human, simian, bovine or porcine origin.²³ The human G3P[3] strain IAL-R2638 was also shown to belong to this genogroup,⁸ a finding which is confirmed in the present amino acid analysis.

The main hypothesis on the basis of many methods of phylogenetic analysis is that all features undergo evolution independently of each other.¹² However, this supposition could not be completely applied for polypeptides because potentially unfavorable effect of some nucleotide substitutions may be compensated by one or several

substitutions in other positions of the sequence (i.e. coordinated or correlated substitutions).^{24,25} Relatively high proportion of coordinated substitutions may result in significant errors in phylogenetic analysis, and an incorrect topology of a phylogenetic tree.¹² It should be noted that the same topology exhibited by phylogenetic trees in Luchs et al⁸ study was maintained in the present amino acid-based trees, reinforcing the rather stable relationship between G3P[3] strains.

The VP7 hyper variable regions A-F was completely identical between IAL-R2638 and the strains A79-10 (canine), CU-1 (canine), RV198-95 (human), HCR3A (human), Ro1845 (human), and Cat97 (feline); with amino acid sequence identity ranging from 98.8 to 99.2%. Therefore, the amino acid divergence was located outside the variable regions. However, the evolutionary value of this data remains unclear. Interestingly, the amino acid identity of VP7 protein was higher (99.2%) between canine-derived human HCR3A (USA) and IAL-R2638 (Brazil) strains. Taking the risks, it could be suggested that canine RVA might acquire mutations during replication in a heterologous host (i.e. humans). Geographic location may also play a role in this high amino acid identity observed, since both strains were detected in American Continent.

In addition, IAL-R2638 strain shared the amino acid substitutions at positions 147^{A→T}, 212^{A/T→V}, 213^{A/T/N→V}, and 242^{A/N/S→V} with the canine-feline genogroup strains, including the canine-feline-derived human RVA strains (i.e. HCR3A and Ro1845). The amino acid substitution at position 147^{A→T} occurred inside of the major antigenic site, region D (amino acids 143 to 152). The amino acid substitution at positions 212^{A/T→V} and 213^{A/T/N→V} occurred inside the antigenic site E (amino acid 207 to 220), which is spatially very close to site D. Some authors have been described region E ranging from amino acid 208 to 223/224^{26,27}; therefore, the amino acid substitution at position 221^{A→T}, could also be considered inside antigenic site E. Bearing in mind all data together, those substitutions could modify the antigenicity of the corresponding region, and maybe change the virus interaction with the immune system. The precise impact of amino acid changes cannot be predicted from sequence information alone,²⁸ and studies attempting to correlate intragenotypic nucleotide differences with antigenic differences are extremely important.²⁹

The potential VP7 N-linked glycosylation site located at amino acid 69 in IAL-R2638 strain tends to be conserved among RVA strains.³⁰ Recently, the circulating Belgian G3 RVA strains were found to possibly possess an extra N-linked glycosylation site at amino acid 238.²⁸ Glycosylation of residue 238 could have far-ranging effects on the immunogenicity, and has previously been shown to reduce neutralization of animal RVA strains by hyper immune sera and monoclonal antibodies.²⁶ The G3 RVA vaccine strain of RotaTeqTM does not display this additional glycosylation site at amino acid 238,²⁸ as well as the G3P[3] canine-feline genogroup strains. Therefore, theoretically, this vaccine could efficiently protect against G3P[3] genotype infections, considering its highly conserved genome origin.

Trypsin cleavage of VP4 spike protein which yields two polypeptides, VP8* and VP5* is required for the activation of infectivity.³¹ The potential VP4 arginine/lysine cleavage sites (231, 241 and 247) were maintained in strain IAL-R2638, ensuring infectivity. The four proline residues (68, 71, 225 and 226) are conserved in IAL-R2638 strain. These conserved prolines may have a major influence on the conformation of VP4, because proline is known to distort three-dimensional structure.³¹ It is known that there is a diversity of VP4 sequences in RVA. Animal RVA strains, including canine and feline P[3] strains, were found to have different amino acids in the positions corresponding to those in common human RVA.³² The previously identified

cysteine residue at position 215, proline residues at position 224 and 225, and arginine residues at positions 230, 240, and 246 in human VP4 RVA are found at position 216 (C), 225 (P), 226 (P), 231 (R), 241 (R), and 247 (R), respectively, in animal strains.^{31,32} These differences at amino acid positions were observed in the IAL-R2638 analysis. In fact, a comparison of the VP8* fragment amino acid sequences of seven representative P genotype strains (Wa and WI61 for genotype P[8], DS-1 for genotype P[4], Gottfried and M37 for genotype P[6], K9 and HCR3A for genotype P[3]) indicated a insertion of three nucleotides in P[3] strains: two timines at positions 399 and 400, and one citocine at position 409 (data not shown). Probably, the insertion of these three nucleotides resulted in the addition of an amino acid after position 132.

The present data indicate that the VP4 protein of four P[3] strains (simian RRV, human CMH222, caprine GVR, and buffalo 10733) displayed only 84.2-85% amino acid identities (77.5-77.7% nucleotide identities) with the canine-feline genogroup. Previous phylogenetic analysis of relationship among G3P[3] RVA of VP4 gene have already revealed two major lineages within P[3] genotype, keeping these 4 strains together in a separate group.^{8,18,19,33}

In summary, data from amino acid analysis were consistent with the sequence data of VP7 and VP4 gene segments of the IAL-R2638 strain, supporting its possible canine origin. However, the choice of the variable regions of VP7 and VP4 to serve as evidence for evolutionary relationships between G3P[3] strains was arbitrary; and other combinations would probably give similar results. It is worth mentioning that this study analyzed only two RVA proteins from IAL-R2638 strain, and it is also possible that one or more of its other segments were derived from human RVA strains making it a human-animal reassortant. In addition, the present study raises the question as to whether the amino acid-based trees could be applied as an approach to the study of RVA evolution, avoiding incorrect phylogenetic reconstructions.^{9,10,11,12}

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Enteric Diseases Laboratory of Adolfo Lutz Institute staff: Rita de Cássia C. Carmona for laboratorial supervision; Audrey Cilli and Simone G. Morillo for laboratorial analysis assistance; Antonio Erculiani Junior and Sirlene Henrique Rodrigues Silva for technical assistance.

REFERENCES

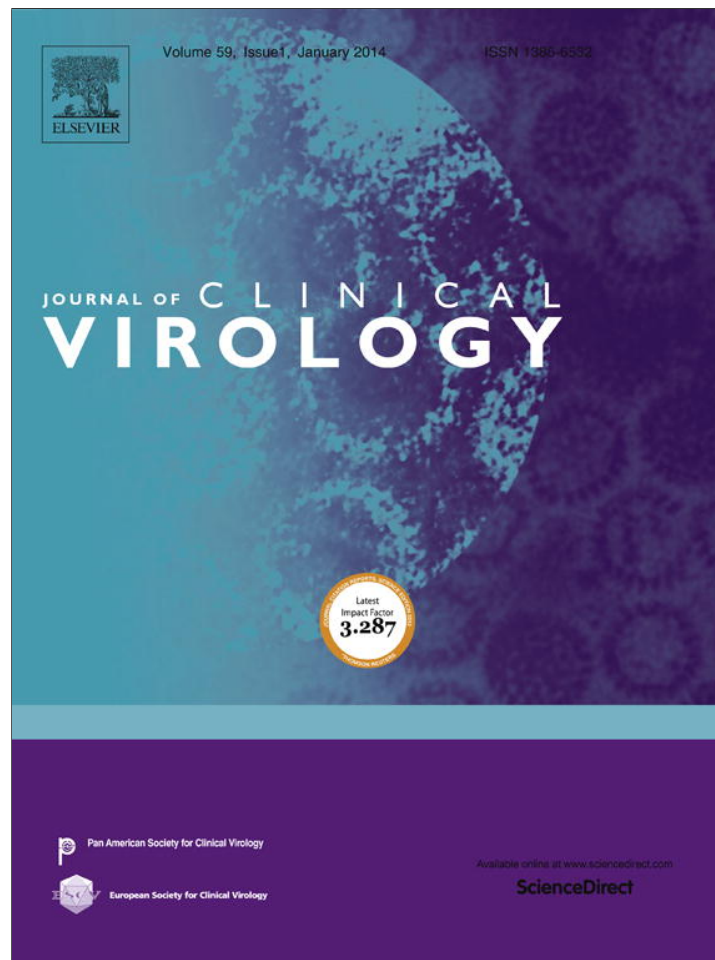
- Kapikian AZ, Hoshino Y, Chanock RM. Rotaviruses. In: Knipe DM, Howley RM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE, editors. *Fields Virology*, 4th ed., Vol 2. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2001. p. 1787-1833.
- Santos N, Hoshino Y. Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *Rev Med Virol*. 2005 Jan-Feb;15(1):29-56. Review. PubMed PMID: 15484186.
- Wu FT, Bányai K, Lin JS, Wu HS, Hsiung CA, Huang YC, Hwang KP, Jiang B, Gentsch JR. Putative canine origin of rotavirus strain detected in a child with diarrhea, Taiwan. *Vector Borne Zoonotic Dis* [Internet]. 2012 Feb [cited 2013 Jul 15];12(2):170-3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3267547/pdf/vbz.2011.0708.pdf>. doi: <http://dx.doi.org/10.1089/vbz.2011.0708>. Epub 2011 Oct 24. PubMed PMID: 22022813; PubMed Central PMCID: PMC3267547
- Morillo SG, Luchs A, Cilli A, Costa FF, Carmona Rde C, Timenetsky Mdo C. Characterization of rotavirus strains from day care centers: pre- and post-rotavirus vaccine era. *J Pediatr (Rio J)* [Internet]. 2010 Mar-Apr [cited 2013 Jul 15];86(2):155-8. Available from: http://www.scielo.br/pdf/jped/v86n2/en_v86n2a13.pdf. doi: <http://dx.doi.org/10.2223/JPED.1981>. PubMed PMID: 20361122.
- Ruiz-Palacios GM, Pérez-Schael I, Velázquez FR, Abate H, Breuer T, Clemens SC, Cheuvart B, Espinoza F, Gillard P, Innis BL, Cervantes Y, Linhares AC, López P, Macías-Parra M, Ortega-Barría E, Richardson V, Rivera-Medina DM, Rivera L, Salinas B, Pavía-Ruz N, Salmerón J, Rüttimann R, Tinoco JC, Rubio P, Nuñez E, Guerrero ML, Yarzabal JP, Damaso S, Tornieporth N, Sáez-Llorens X, Vergara RF, Vesikari T, Bouckenoghe A, Clemens R, De Vos B, O’Ryan M; Human Rotavirus Vaccine Study Group. Safety and efficacy of an attenuated vaccine against severe rotavirus gastroenteritis. *N Engl J Med* [Internet]. 2006 Jan 5 [cited 2013 Jul 15];354(1):11-22. Available from: <http://www.nejm.org/doi/pdf/10.1056/NEJMoa052434>. PubMed PMID: 16394298.
- Vesikari T, Matson DO, Dennehy P, Van Damme P, Santosham M, Rodriguez Z, Dallas MJ, Heysse JF, Goveia MG, Black SB, Shinefield HR, Christie CD, Ylitalo S, Itzler RF, Coia ML, Onorato MT, Adeyi BA, Marshall GS, Gothefors L, Campens D, Karvonen A, Watt JP, O’Brien KL, DiNubile MJ, Clark HF, Boslego JW, Offit PA, Heaton PM; Rotavirus Efficacy and Safety Trial (REST) Study Team. Safety and efficacy of a pentavalent human-bovine (WC3) reassortant rotavirus vaccine. *N Engl J Med* [Internet]. 2006 Jan 5 [cited 2013 Jul 15];354(1):23-33. Available from: <http://www.nejm.org/doi/pdf/10.1056/NEJMoa052664>. PubMed PMID: 16394299.
- Grant L, Esona M, Gentsch J, Watt J, Reid R, Weatherholtz R, Santosham M, Parashar U, O’Brien K. Detection of G3P[3] and G3P[9] rotavirus strains in American Indian children with evidence of gene reassortment between human and animal rotaviruses. *J Med Virol*. 2011 Jul;83(7):1288-99. doi: <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.22076>. PubMed PMID: 21567432.
- Luchs A, Cilli A, Morillo SG, Carmona Rde C, Timenetsky Mdo C. Rare G3P[3] rotavirus strain detected in Brazil: possible human-canine interspecies transmission. *J Clin Virol*. 2012 May;54(1):89-92. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2012.01.025>. Epub 2012 Mar 6. PubMed PMID: 22398035.
- Matsuda H. Construction of Phylogenetic Trees from Amino Acid Sequences using a Genetic Algorithm. In: Hagiya M, Suyama A, Takagi T, Nakai K, Miyano S, Yokomori T, editors. *Proceedings of Genome Informatics Workshop* [Internet]; 1995 [cited 2013 Jul 15]; Tokyo (Japan): Universal Academy Press; 1995. p. 19-28. Available from: <http://www.jsbi.org/pdfs/journal1/GIW95/Oral/GIW95O03.pdf>.
- Ahmad S, Selvapandiyar A, Bhatnagar RK. A protein-based phylogenetic tree for gram-positive bacteria derived from hrcA, a unique heat-shock regulatory gene. *Int J Syst Bacteriol* [Internet]. 1999 Oct [cited 2013 Jul 15];49 Pt 4:1387-94. Available from: <http://ijs.sgmjournals.org/content/49/4/1387.long>. PubMed PMID: 10555317.
- Foster PG, Hickey DA. Compositional bias may affect both DNA-based and protein-based phylogenetic reconstructions. *J Mol Evol*. 1999 Mar;48(3):284-90. doi: <http://dx.doi.org/10.1007/PL00006471>. PubMed PMID: 10093217.
- Sherbakov DY, Triboy TI. Effect of co-evolving amino acid residues on topology of phylogenetic trees. *Biochemistry (Mosc)* [Internet]. 2007 Dec [cited 2013 Jul 15];72(12):1363-7. Available from: http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya/contents/v72/pdf/bcm_1363.pdf. PubMed PMID: 18205620.
- Gentsch JR, Glass RI, Woods P, Gouvea V, Gorziglia M, Flores J, Das BK, Bhan MK. Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* [Internet]. 1992 Jun [cited 2013 Jul 15];30(6):1365-73. Available from: <http://jcm.asm.org/content/30/6/1365.long>. PubMed PMID: 1320625; PubMed Central PMCID: PMC265294.
- Gouvea V, Glass RI, Woods P, Taniguchi K, Clark HF, Forrester B, Fang ZY. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *J Clin Microbiol* [Internet]. 1990 Feb [cited 2013 Jul 15];28(2):276-82. Available from: <http://jcm.asm.org/content/28/2/276.long>. PubMed PMID: 2155916; PubMed Central PMCID: PMC269590.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* [Internet]. 2007 Aug [cited 2013 Jul 15];24(8):1596-9. Available from: <http://mbe.oxfordjournals.org/content/24/8/1596.full.pdf+html>. Epub 2007 May 7. PubMed PMID: 17488738.
- Martella V, Pratelli A, Elia G, Decaro N, Tempesta M, Buonavoglia C. Isolation and genetic characterization of two G3P5A[3] canine rotavirus strains in Italy. *J Virol Methods*. 2001 Jul;96(1):43-9. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0166-0934\(01\)00312-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0166-0934(01)00312-3). PubMed PMID: 11516488.
- De Grazia S, Martella V, Giammanco GM, Gòmara MI, Ramirez S, Cascio A, Colomba C, Arista S. Canine-origin G3P[3] rotavirus strain in child with acute gastroenteritis. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2007 Jul [cited 2013 Jul 15];13(7):1091-3. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2878246/pdf/07-0239_finalD.pdf. PubMed PMID: 18214189; PubMed Central PMCID: PMC2878246.
- Khamrin P, Maneeekarn N, Peerakome S, Yagyu F, Okitsu S, Ushijima H. Molecular characterization of a rare G3P[3] human rotavirus reassortant strain reveals evidence for multiple human-animal interspecies transmissions. *J Med Virol*. 2006 Jul;78(7):986-94. doi: <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.20651>. PubMed PMID: 16721863.
- Santos N, Clark HF, Hoshino Y, Gouvea V. Relationship among serotype G3P5A rotavirus strains isolated from different host species. *Mol Cell Probes*. 1998 Dec;12(6):379-86. doi: <http://dx.doi.org/10.1006/mcpr.1998.0198>. PubMed PMID: 9843655.
- Timenetsky Mdo C, Santos N, Gouvea V. Survey of rotavirus G and P types associated with human gastroenteritis in São Paulo, Brazil, from 1986 to 1992. *J Clin Microbiol* [Internet]. 1994 Oct;32(10):2622-4. Available from: <http://jcm.asm.org/content/32/10/2622.long>. PubMed PMID: 7814514; PubMed Central PMCID: PMC264121.

21. Nakagomi T, Nakagomi O. Human rotavirus HCR3 possesses a genomic RNA constellation indistinguishable from that of feline and canine rotaviruses. *Arch Virol*. 2000;145(11):2403-9. doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s007050070029>. PubMed PMID: 11205126.
22. Matthijssens J, De Grazia S, Piessens J, Heylen E, Zeller M, Giammanco GM, Bányai K, Buonavoglia C, Ciarlet M, Martella V, Van Ranst M. Multiple reassortment and interspecies transmission events contribute to the diversity of feline, canine and feline/canine-like human group A rotavirus strains. *Infect Genet Evol*. 2011 Aug;11(6):1396-406. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2011.05.007>. Epub 2011 May 13. PubMed PMID: 21609783.
23. Tsugawa T, Hoshino Y. Whole genome sequence and phylogenetic analyses reveal human rotavirus G3P[3] strains Ro1845 and HCR3A are examples of direct virion transmission of canine/feline rotaviruses to humans. *Virology*. 2008 Oct 25;380(2):344-53. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2008.07.041>. Epub 2008 Sep 11. PubMed PMID: 18789808; PubMed Central PMCID: PMC2575048.
24. Hughes AL, Yeager M. Coordinated amino acid changes in the evolution of mammalian defensins. *J Mol Evol*. 1997 Jun;44(6):675-82. doi: <http://dx.doi.org/10.1007/PL00006191>. PubMed PMID: 9169560.
25. Pazos F, Helmer-Citterich M, Ausiello G, Valencia A. Correlated mutations contain information about protein-protein interaction. *J Mol Biol*. 1997;271(4):511-23. doi: <http://dx.doi.org/10.1006/jmbi.1997.1198>. PubMed PMID: 9281423.
26. Ciarlet M, Hoshino Y, Liprandi F. Single point mutations may affect the serotype reactivity of serotype G11 porcine rotavirus strains: a widening spectrum? *J Virol* [Internet]. 1997 Nov [cited 2013 Jul 15];71(11):8213-20. Available from: <http://jvi.asm.org/content/71/11/8213.long>. PubMed PMID: 9343172; PubMed Central PMCID: PMC192278.
27. Dyal-Smith ML, Lazdins I, Tregear GW, Holmes IH. Location of the major antigenic sites involved in rotavirus serotype-specific neutralization. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1986 May [cited 2013 Jul 15];83(10):3465-8. Available from: <http://www.pnas.org/content/83/10/3465.long>. PubMed PMID: 2422651; PubMed Central PMCID: PMC323536.
28. Zeller M, Patton JT, Heylen E, De Coster S, Ciarlet M, Van Ranst M, Matthijssens J. Genetic analyses reveal differences in the VP7 and VP4 antigenic epitopes between human rotaviruses circulating in Belgium and rotaviruses in Rotarix and RotaTeq. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2012 Mar [cited 2013 Jul 15];50(3):966-76. Available from: <http://jcm.asm.org/content/50/3/966.full.pdf+html>. doi: <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.05590-11>. Epub 2011 Dec 21. PubMed PMID: 22189107; PubMed Central PMCID: PMC3295124.
29. Hoshino Y, Jones RW, Ross J, Honma S, Santos N, Gentsch JR, Kapikian AZ. Rotavirus serotype G9 strains belonging to VP7 gene phylogenetic sequence lineage 1 may be more suitable for serotype G9 vaccine candidates than those belonging to lineage 2 or 3. *J Virol* [Internet]. 2004 Jul [cited 2013 Jul 15];78(14):7795-802. Available from: <http://jvi.asm.org/content/78/14/7795.full.pdf+html>. PubMed PMID: 15220453; PubMed Central PMCID: PMC434108.
30. Martella V, Ciarlet M, Pratelli A, Arista S, Terio V, Elia G, Cavalli A, Gentile M, Decaro N, Greco G, Cafiero MA, Tempesta M, Buonavoglia C. Molecular analysis of the VP7, VP4, VP6, NSP4, and NSP5/6 genes of a buffalo rotavirus strain: identification of the rare P[3] rhesus rotavirus-like VP4 gene allele. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2003 Dec [cited 2013 Jul 15];41(12):5665-75. Available from: <http://jcm.asm.org/content/41/12/5665.full.pdf+html>. PubMed PMID: 14662959; PubMed Central PMCID: PMC309001.
31. Gorziglia M, Green K, Nishikawa K, Taniguchi K, Jones R, Kapikian AZ, Chanock RM. Sequence of the fourth gene of human rotaviruses recovered from asymptomatic or symptomatic infections. *J Virol* [Internet]. 1988 Aug;62(8):2978-84. Available from: <http://jvi.asm.org/content/62/8/2978.long>. PubMed PMID: 2839714; PubMed Central PMCID: PMC253736.
32. Taniguchi K, Urasawa T, Urasawa S. Species specificity and interspecies relatedness in VP4 genotypes demonstrated by VP4 sequence analysis of equine, feline, and canine rotavirus strains. *Virology*. 1994 May 1;200(2):390-400. doi: <http://dx.doi.org/10.1006/viro.1994.1203>. PubMed PMID: 8178429.
33. Matthijssens J, Taraporewala ZF, Yang H, Rao S, Yuan L, Cao D, Hoshino Y, Mertens PP, Carner GR, McNeal M, Sestak K, Van Ranst M, Patton JT. Simian rotaviruses possess divergent gene constellations that originated from interspecies transmission and reassortment. *J Virol* [Internet]. 2010 Feb [cited 2013 Jul 15];84(4):2013-26. Available from: <http://jvi.asm.org/content/84/4/2013.full.pdf+html>. doi: <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.02081-09>. Epub 2009 Nov 25. PubMed PMID: 19939934; PubMed Central PMCID: PMC2812371.

Como citar este artigo / How to cite this article:

Luchs A, Timenetsky MCT. Amino Acid sequence analysis of the two major outer capsid proteins (VP7 and VP4) from human-derived canine G3P[3] Rotavirus strain detected in Brazil. *J Health Biol Sci*. 2013 Oct-Dec; 1(4):145-153.

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/authorsrights>



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Clinical Virology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jcv

Letter to the Editor

Unexpected detection of bovine G10 rotavirus in a Brazilian child with diarrhea**Keywords:**Gastroenteritis
Interspecies transmission
Zoonotic transmission

Group A Rotavirus (RVA) has been reported as the major etiologic pathogen causing gastroenteritis in human and animal [1]. On January 2012, an unusual strain G10P[?] (IAL-R2803) was detected in a 3-year-old male child with acute gastroenteritis during the epidemiological survey in Presidente Prudente city, São Paulo, Brazil. RVA strains with G10 specificity are usually detected in calves, and rarely detected in humans [2–5].

Phylogenetic analysis based on VP7 gene showed that IAL-R2803 strain (accession number JX566991) had highest nucleotide identity to bovine strain DQ-75, isolated in China in 2008 (94.6% nt; 98.9% aa). IAL-R2803 strain also exhibited high nucleotide and amino acid identity to bovine strains RVL-Bov2 (93.6% nt; 98.3% aa), VICG10.01 (93.6% nt; 97.2% aa), RVL-Bov3 (93.4% nt; 98.3% aa), B11 (93.4% nt; 97.8% aa), XJX-07 (93.4% nt; 97.8% aa), and MX001 (92.9% nt; 97.2%); and to human strain 163 (93.4% nt; 96.7% aa). When compared with other human G10 strains, strain IAL-R2803 had only 84.8–89.9% nucleotide homology (90.2–96.1% aa), including the Brazilian strain R239 (86.1% nt; 94% aa) (Fig. 1). Although several attempts were made to obtain the VP4 genotype, they were unsuccessful.

Genetic analysis of IAL-R2803 strain revealed that the VP7 gene displayed a possible bovine origin. Although human G10 strains

had already been described and sequenced in Brazil [2], this is the first strong evidence of an animal G10 strain interspecies transmission in the country. It is noteworthy that one or more of its other segments could be derived from human RVA strains making it a human–animal reassortant. Genetic characterization of additional genes is necessary to determine the full genetic profile of this strain [4].

Presidente Prudente city is located in a country site area of Brazil, and known for its large bovine herd. In addition, available data on circulating bovine RVA strains in Brazil have reported G6 and G10 as the most common G-types found in herds [6,7]. In country sites areas, domestic animals and humans live close together in rural villages, and often share the same source of water, increasing the chance of animal–human transmission and mixed infections [3]. Therefore it was not surprising that a G10 strain, known to circulate in bovine herds, could be detected in a Brazilian child living in the same region. Unfortunately, none of the animals from the sampling site were screened for the presence of RVA.

Surveillance studies has shown that animal strains can contribute to generating diversity among the human RVA population [8], and could become an increasingly important contributor to diversity due to vaccine selective pressure [9]. There is an urgent need to include pet and domestic animals in the RVA surveillance programs because their close contact with humans (especially from rural areas); increased reports of the detection of strains unique to animals in human populations, and the increasing spread and isolation of strains with unusual VP7 and VP4 genotypes [3,5,8]. Sequencing of both animal and human RVA genes is need in order to comprehend better the extent to which reassortment and interspecies transmission contribute to diversity in both species.

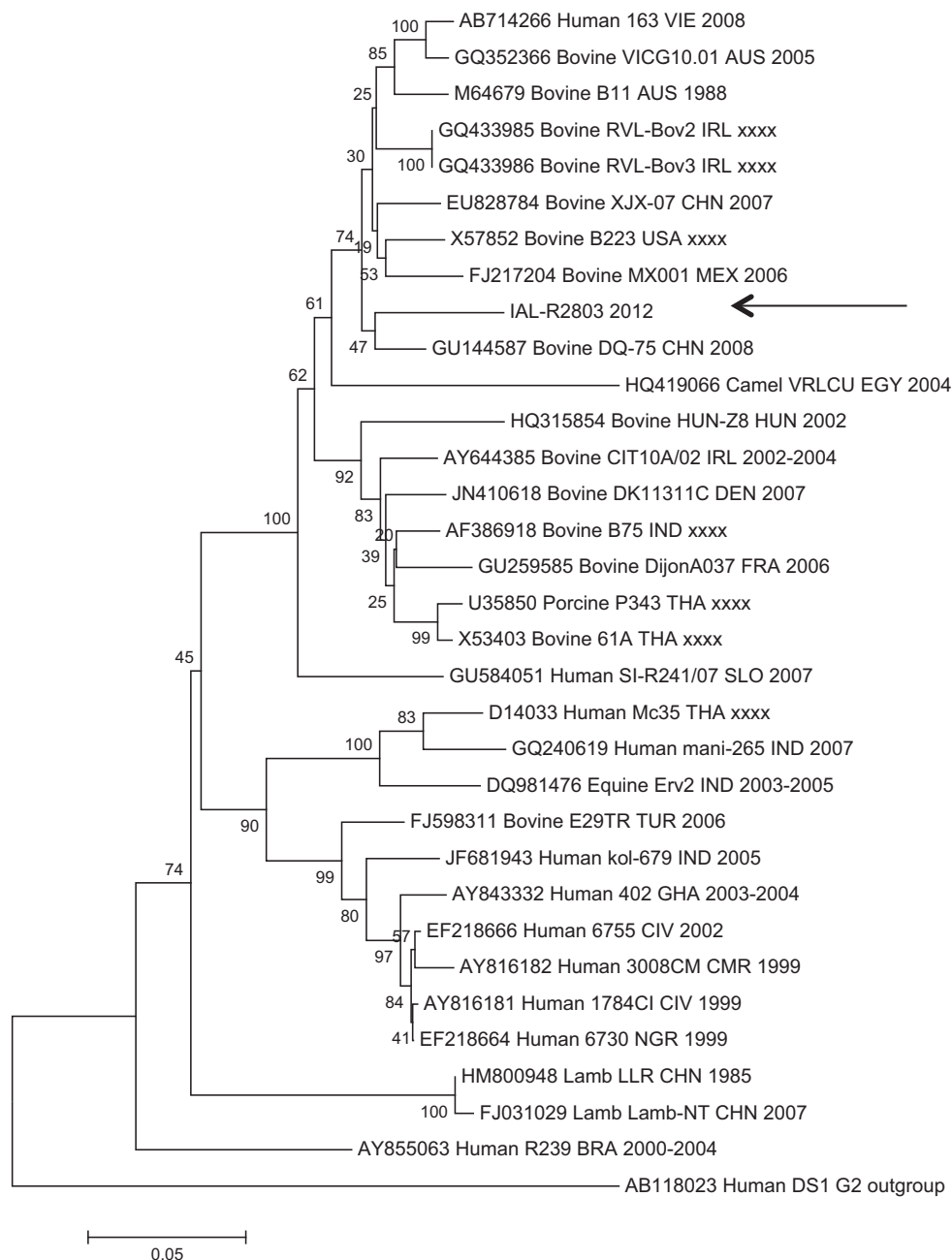


Fig. 1. Nucleotide based phylogenetic relatedness of IAL-R2803 RVA G10 VP7 gene (indicated by the arrow) to other selected human and animal G10 strains. Neighbor-joining tree of the partial VP7 nucleotide sequence was generated with MEGA 4.0 software. Reference G10 strains were obtained from GenBank database. Accession number, species, isolates, countries and year of each strain are indicated. The scale indicates the number of divergent nucleotide residues. Percentages of bootstrap values are shown at the branch node.

Conflict of interest

None.

Funding

None.

Ethical approval

Previous ethics committee approval was granted by Adolfo Lutz Institute – São Paulo – Brazil (Ref. 14/05; Ref. 53/05). This was an anonymous unlinked study and informed consent was not required according to the resolution 196/96 concerning research involving

humans beings – Conselho Nacional de Saúde (CNS)/Ministério da Saúde (MS), Brasília, 1996.

Acknowledgments

We thank the Enteric Diseases Laboratory of Adolfo Lutz Institute staff: Rita de Cássia C. Carmona for laboratorial supervision; Adeline M. Fernandes, Audrey Cilli, Carolina J. Gill, Cibele D. Ribeiro and Simone G. Morillo for laboratorial assistance; Antonio Erculiani Junior and Sirlene Henrique Rodrigues Silva for technical assistance. We are grateful to Centers for Surveillance, São Paulo State Health Department (CVE) for assistance in sample collection and epidemiological data.

References

- [1] Estes MK, Kapikian AZ. Rotaviruses. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DD, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE, editors. *Fields virology*. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott, Williams and Wilkins; 2007. p. 1917–74.
- [2] Volotão EM, Soares CC, Maranhão AG, Rocha LN, Hoshino Y, Santos N. Rotavirus surveillance in the city of Rio de Janeiro-Brazil during 2000–2004: detection of unusual strains with G8P[4] or G10P[9] specificities. *J Med Virol* 2006;78(2):263–72.
- [3] Esona MD, Page NA, Akran VA, Armah GE, Steele AD. Characterization of 2 human genotype G10 rotavirus strains, 3008CM and 1784/CI/1999, isolated in Cameroon and Cote d'Ivoire during the 1999–2000 rotavirus season. *J Infect Dis* 2010;202(Suppl.):S212–9.
- [4] Esona MD, Banyai K, Foytich K, Freeman M, Mijatovic-Rustempasic S, Hull J, et al. Genomic characterization of human rotavirus G10 strains from the African Rotavirus Network: relationship to animal rotaviruses. *Infect Genet Evol* 2011;11(1):237–41.
- [5] Mukherjee A, Nayak MK, Roy T, Ghosh S, Naik TN, Kobayashi N, et al. Detection of human G10 rotavirus strains with similarity to bovine and bovine-like equine strains from untypable samples. *Infect Genet Evol* 2012;12(2):467–70.
- [6] Alfieri AF, Alfieri AA, Barreiros MA, Leite JP, Richtzenhain LJ. G and P genotypes of group A rotavirus strains circulating in calves in Brazil, 1996–1999. *Vet Microbiol* 2004;99(3/4):167–73.
- [7] Caruzo TA, Brito WM, Munford V, Rácz ML. Molecular characterization of G and P-types bovine rotavirus strains from Goiás, Brazil: high frequency of mixed P-type infections. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2010;105(8):1040–3.
- [8] Luchs A, Cilli A, Morillo SG, Carmona Rde C, Timenetsky Mdo C. Rare G3P[3] rotavirus strain detected in Brazil: possible human-canine interspecies transmission. *J Clin Virol* 2012;54(1):89–92.
- [9] Matthijnssens J, Bilcke J, Ciarlet M, Martella V, Banyai K, Rahman M, et al. Rotavirus disease and vaccination: impact on genotype diversity. *Future Microbiol* 2009;4(10):1303–16.

Adriana Luchs*

Maria do Carmo Sampaio Tavares Timenetsky*

Adolfo Lutz Institute, Virology Center, Enteric Diseases Laboratory, São Paulo, SP, Brazil

* Corresponding authors at: Instituto Adolfo Lutz, Centro de Virologia, Núcleo de Doenças Entéricas, Av. Dr Arnaldo, No. 355, São Paulo, SP 01246-902, Brazil. Tel.: +55 11 3068 2909;

fax: +55 11 3088 3753.

E-mail addresses: driluchs@gmail.com

(A. Luchs), timenetsky.m@gmail.com

(M.d.C.S.T. Timenetsky)

11 October 2013

G8P[6] rotaviruses isolated from Amerindian children in Mato Grosso do Sul, Brazil, during 2009: close relationship of the G and P genes with those of bovine and bat strains

Adriana Luchs and Maria do Carmo Sampaio Tavares Timenetsky

Enteric Disease Laboratory, Adolfo Lutz Institute, São Paulo, Brazil

Correspondence
Adriana Luchs
driluchs@gmail.com

During the 2009 national group A rotavirus (RVA) surveillance, five unusual strains of the human G8P[6] genotype were detected in Brazilian Indian children with acute gastroenteritis. The aim of this study was to carry out sequence analysis of the two outer capsid proteins (VP4 and VP7) and the inner capsid protein (VP6) of the G8P[6] strains detected in order to provide further information on the genetic relationship between human and animal RVA. A total of 68 stool samples, collected in Mato Grosso do Sul during 2009, were tested for RVA using ELISA, followed by reverse transcriptase-PCR and sequencing. RVA infection was detected in 7.3% of samples (5/68). The IAL-RN376 G8 sequence shares a clade with bovine and human strains, displaying highest nucleotide identity to African human strains DRC86 and DRC88, followed by African bovine strain NGRBg8. IAL-RN376 and IAL-RN377 P[6] sequences showed highest identity to human strain R330 from Ireland, and a close genetic relationship to African fruit bat RVA strain KE4852/07. Strains IAL-RN376 and IAL-RN377 display genogroup I VP6 specificity and the I2 genotype, and share high nucleotide identities with human strains B1711, 272-BF and 06-242, and moderate identities with bovine (RUBV81, 86 and KJ9-1) and porcine (HP140) strains. This study suggested that a reassortment between bovine and bat RVA strains could have occurred in animal host(s) preceding the transmission to humans. In the indigenous population, zoonotic transmission is probably fairly frequent as the inhabitants live in close contact with animals under conditions of poor hygiene.

Received 6 August 2013
Accepted 19 November 2013

INTRODUCTION

Group A rotavirus (RVA) is an important aetiological agent of gastroenteritis in humans and animals. RVA usually exhibits host species restriction; however, a number of atypical RVA strains isolated from humans and animals share genetic and antigenic features of virus strains from heterologous species (Khamrin *et al.*, 2006; Matthijnsens *et al.*, 2008a), suggesting that interspecies transmission or reassortment between animal and human viruses can occur (Timenetsky *et al.*, 1997; Kapikian *et al.*, 2001; Estes & Kapikian, 2007; Matthijnsens *et al.*, 2011; Luchs *et al.*, 2012). The two outer capsid proteins, VP4 and VP7, allow classification into P and G genotypes, respectively, and sequence analysis of the genes that code for these proteins is useful for gathering epidemiological information and tracing the origin of unusual RVA strains (Cook *et al.*, 2004; De Grazia *et al.*, 2007; Steyer *et al.*, 2008; Martella *et al.*, 2010; Luchs *et al.*, 2012; Mukherjee *et al.*, 2013;

Mullick *et al.*, 2013). Strains with uncommon VP7 and VP4 genes, regarded as animal-like, have been identified sporadically in humans and have acquired epidemiological relevance in some geographical areas (Iturriza-Gómara *et al.*, 2004). The VP6 protein is the major structural component of the virion; it is highly antigenic and immunogenic, and might play a role in inducing protective immunity (Estes & Kapikian, 2007).

During 2009 national RVA surveillance, five unusual strains of the human G8P[6] genotype were detected in Brazilian Indian children with acute gastroenteritis. RVA strains with G8 specificity are usually detected in calves (Martella *et al.*, 2010). However, human G8 strains have been reported globally, including in Brazil (Santos *et al.*, 1998; Volotão *et al.*, 2006; Bányai *et al.*, 2009; Esona *et al.*, 2009; Page *et al.*, 2010; Ghosh *et al.*, 2011; Midgley *et al.*, 2012; Mukherjee *et al.*, 2013), and have often been characterized as originating from zoonotic transmissions. The P[6] genotype can circulate reasonably efficiently in the human population (Martella *et al.*, 2006) and has been detected in Brazil since the 1980s (Timenetsky *et al.*, 1994; Carmona *et al.*, 2004, 2006). Nevertheless, recent findings

The GenBank/EMBL/DDBJ accession numbers for the nucleotide sequences of the VP7, VP4 and VP6 genes are JQ693565, JQ693566/JQ693567 and KF718287/KF718288, respectively.

strongly suggest interspecies transmission of RVA P[6] strains between pigs and humans (Martella *et al.*, 2006).

The aim of this study was to carry out sequence analysis of the two outer capsid proteins (VP4 and VP7) and the inner protein (VP6) of the G8P[6] strains detected in order to obtain further information on the genetic relationship between human and animal RVA.

RESULTS

RVA infection was detected in 7.3% of samples (5/68). The median age of the children was 5.6 months and 80% were males. Three RVA samples exhibited a short profile by PAGE, and two were negative. Using reverse transcriptase (RT)-PCR genotyping of the VP7 and VP4 genes with panels of primers specific for various human G and P types, and genotyping of the VP6 gene, all samples were characterized as G8-P[6]-I2 (Table 1). One sample of G8 specificity (IAL-RN376), and two samples of P[6] and I2 specificities (IAL-RN376 and IAL-RN377) were selected for sequencing.

Fig. 1 shows a comparison of amino acid sequences of the six antigenic regions A–F (Estes & Kapikian, 2007) between strain IAL-RN376 and reference RVA strains belonging to the G8 genotype. The antigenic regions A–F of strain IAL-RN376 clearly support its classification as genotype G8. There was 100% amino acid homology in all antigenic regions between strain IAL-RN376 and the human strain DRC86 isolated in the Democratic Republic of Congo in 2003 (Fig. 1). The alignment of amino acid sequences deduced from the VP7 gene revealed amino acid substitutions in strain IAL-RN376 inside the variable region C (aa 120–130) at position 122^{T→V}, region D (aa 143–152) at position 146^{A→T}, region E (aa 207–220) at position 218^{V→I} and region F (aa 233–242) at position 237^{I→V}. Amino acid substitutions were also observed outside VP7 hypervariable regions B (aa 87–101), C (aa 120–130), E (aa 207–220) and F (aa 233–242) were the most conserved regions in all strains analysed, whilst regions A (aa 39–50) and D (aa 143–152) were the most variable. The VP7 protein of strain IAL-R2803 had two potential N-linked glycosylation sites located at aa 69 and 238 (Fig. 1).

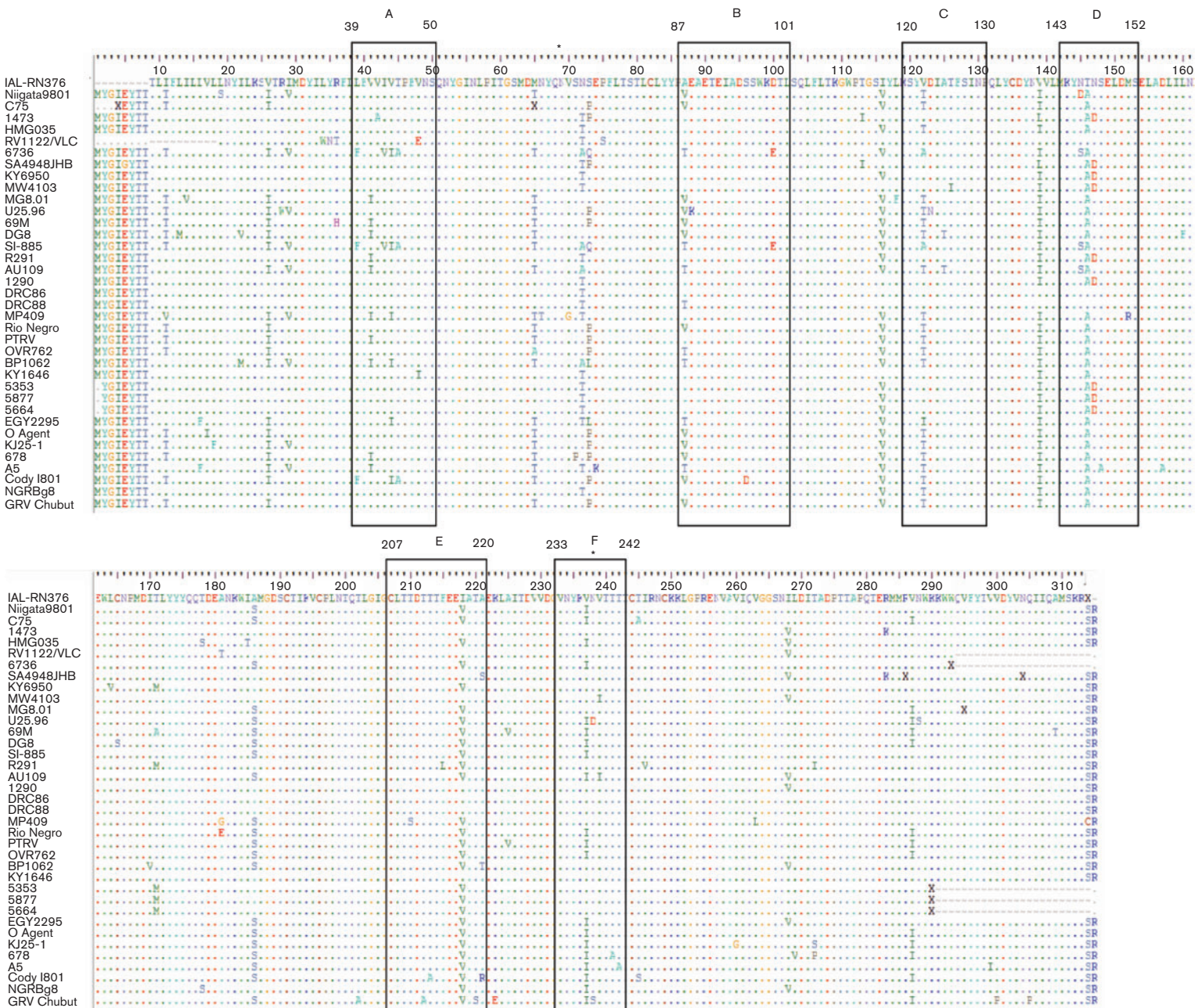
A comparison of the nucleotide and deduced amino acid sequences of strain IAL-RN376 with those of other published human and animal G8 RVAs revealed that the VP7 gene of strain IAL-RN376 had the highest identity to human strains DRC86 (98.9% nt; 99.6% aa) and DRC88 (98.7% nt; 99.3% aa), both isolated in the Democratic Republic of Congo in 2003, followed by human strain RV1122 (97.7% nt; 97.3% aa) isolated in Spain in 2009. Strain IAL-RN376 also exhibited high nucleotide and amino acid identity to the simian strain KY1646 (98% nt; 98.6% aa) and the bovine strain NGRBg8 (95.7% nt; 97% aa), both also isolated on the Africa continent. The high identity shared between strain IAL-RN376 and animal strains was stressed in the phylogenetic tree (Fig. 2).

The comparative sequence analysis revealed that the bovine G8 strain NGRBg8 displayed higher nucleotide identity with human strains (96.1–99.8% nt; 94.4–99.6% aa) and simian strain KY1646 (97.2% nt; 97.7% aa) than with other bovine strains (82.2–86.5% nt; 94.4–96.3% aa). In fact, bovine strain NGRBg8 showed highest genetic identity with human strain HMG035 (99.8% nt; 99.6% aa), isolated in Nigeria in 1999–2000. Bovine strain NGRBg8 also displayed high similarity with other Brazilian human strains: R291 (96.1% nt; 96.7% aa), 5353 (96.9% nt; 97.7% aa), 5877 (96.9% nt; 97.7% aa) and 5664 (96.8% nt; 97.7% aa). When compared with additional human G8 strains used in the present study, strain IAL-RN376 had 84.2–97.8% nt and 93.4–98.3% aa homology, including the human Brazilian strain R291 (95.8% nt; 96.3% aa). The lowest nucleotide and amino acid identity was observed between strain IAL-RN376 and bovine strain Cody I801 (82.6% nt; 93.4% aa) (Fig. 2).

G8 lineages were suggested previously by Fukai *et al.* (2004) and Pietsch *et al.* (2009). On the basis of the VP7 phylogenetic tree, six different lineages were identified, named Lineages I–VI (Fig. 2). Lineage I comprised a single bovine strain (Cody I801) isolated in the USA. Lineage II was occupied by animal strains and an environmental strain (U25.96) detected in Switzerland. Lineage III consisted of three human strains and a single bovine strain (678) from Scotland. Lineage IV consisted of two human strains (6746 and SI-885). Lineage V comprised four human strains and one bovine strain (A5) isolated in Thailand. Lineage VI was the most complex. This lineage consisted of 14 human strains, including strain IAL-RN376 detected in this study

Table 1. Socio-demographic data, rotavirus genotyping and strains of native Brazilian children ≤3 years with acute gastroenteritis detected in the city of Dourados, state of Mato Grosso do Sul, Midwest region, Brazil, in 2009

Age (months)	Sex	Ethnicity	Month	Electrophoresis profile	Genotype	RVA vaccine	Strain
12	M	Amambai Village	August	Negative	G8-P[6]-I2	No	–
2	F	Bororó Village	September	Short	G8-P[6]-I2	No	–
5	M	Bororó Village	September	Short	G8-P[6]-I2	Yes	–
6	M	Bororó Village	September	Negative	G8-P[6]-I2	Yes	IAL-RN376
3	M	Bororó Village	October	Short	G8-P[6]-I2	No	IAL-RN377



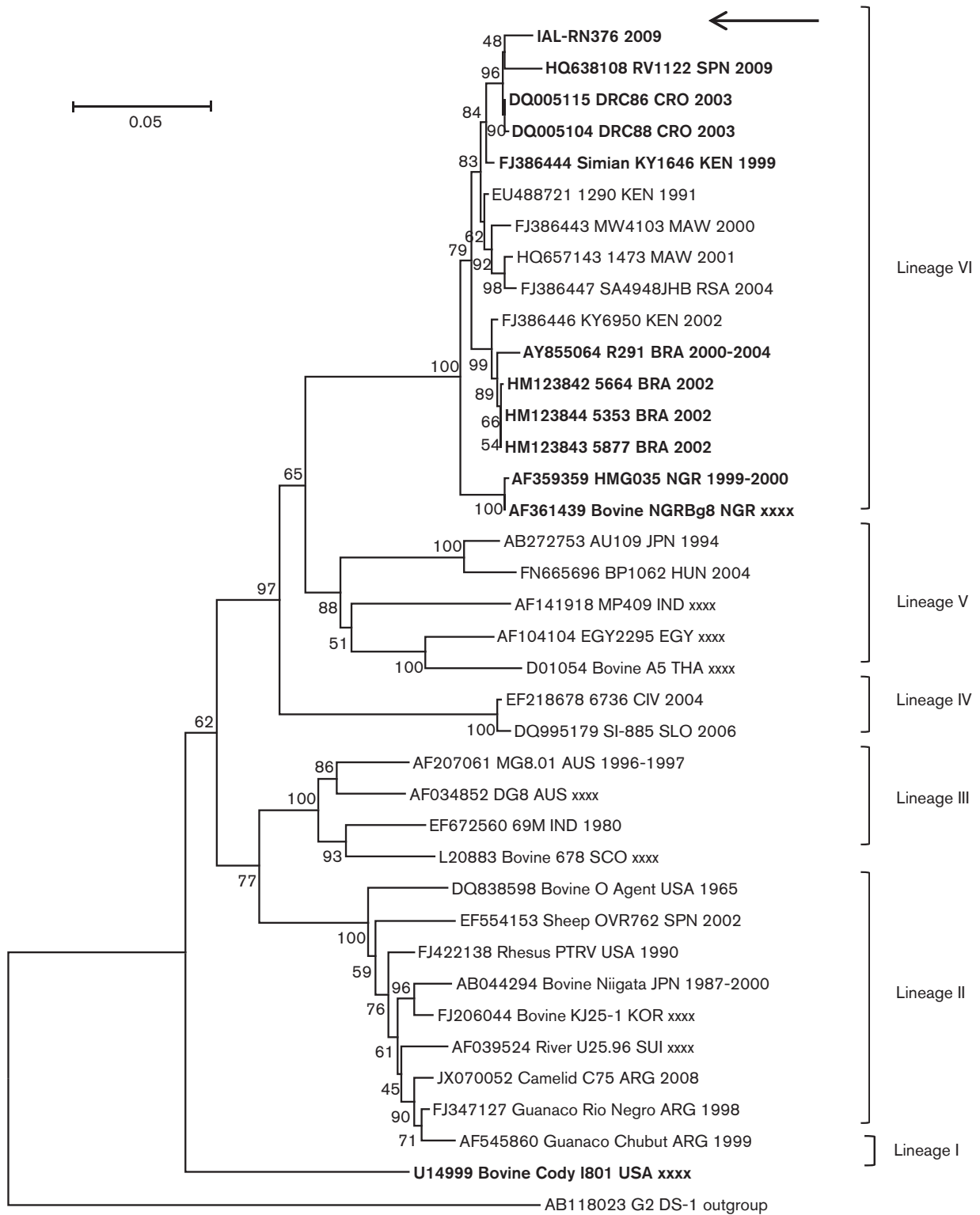


Fig. 2. Nucleotide-based phylogenetic relatedness of the IAL-RN376 RVA G8 VP7 gene (indicated by the arrow) to other selected human and animal G8 strains. The RVA strains of particular interest are highlighted in bold. The neighbour-joining tree of the partial VP7 nucleotide sequence was generated with MEGA 4. Reference G8 strains were obtained from GenBank. Accession number, species, isolate, country and year are indicated for each strain. Roman numerals I–VI represent six different lineages. The scale indicates the number of divergent nucleotide residues. Percentages of bootstrap values are shown at the branch nodes.

and other Brazilian human strains (R291, 5664, 5353 and 5877). In addition, Lineage VI comprised the simian strain KY1646 and bovine strain NGRBg8, both detected in Africa (Fig. 2).

Fig. 3 shows the deduced amino acid sequence of the VP4 (subunit VP8*) of human strains IAL-RN376 and IAL-RN377, and representative VP4 amino acid sequences of the RVA P[6] genotype. The potential cleavage sites, arginine (R) 230, 240 and 246, were maintained in strains IAL-RN376 and IAL-RN377. The arginine at position 230 in strains XJ99-468 and BJ-CR4916, isolated in China, were substituted by a lysine (K). The highly conserved cysteine (C) at residue 215, and prolines (P) at residues 68, 71, 224 and 225, were maintained in strains IAL-RN376 and IAL-RN377 (Fig. 3).

Comparative analysis of the deduced amino acid sequences of the IAL-RN376 and IAL-RN377 VP4 fragment (VP8* subunit) showed that the variable region between aa 71 and 204 was fairly conserved among all strains analysed, confirming the classification of strains IAL-RN376 and IAL-RN377 as genotype P[6]. Within the VP8* subunit variable region, substitutions had occurred in strains IAL-RN376 and IAL-RN377 at positions 135^{N→S}, 198^{T→A} and 146^{N→S} (Fig. 3). The amino acid substitution at position 135^{N→S} was also shared by human strains R330 (Ireland), KY6950 (Kenya) and BP1231/02 (Hungary), and by porcine strains detected in Brazil (BRA898/07-Po) and Italy (221/04-19, 221/04-20 and 221/04-21). Amino acid substitutions were also observed outside the VP4 hypervariable region in strains IAL-RN376 and IAL-RN377: 30^{S→N} and 255^{I→V} (Fig. 3).

The overall nucleotide sequence identity between the VP4 gene (VP8* fragment) of strains IAL-RN376 and IAL-RN377 and those of cognate P[6] sequences ranged from 80 to 99.6%. The VP4 sequence of strains IAL-RN376 and IAL-RN377 showed the highest identity to the human R330 strain, isolated in Ireland in 2003–2006, at 99.6% (99.2% aa) and 99.4% (98.4% aa) on the nucleotide level, respectively. Comparison of the IAL P[6] RVA sequences showed 99.8% nt (99.2% aa) similarity among them.

In addition, genetic analysis of the VP4 gene revealed that two Brazilian P[6] human strains (HST435 and HST369) and one human South Korean strain (KMR720) clustered with an African straw-coloured fruit bat (*Eidolon helvum*) RVA strain (KE4852/07) detected in Kenya in 2007 (97.6% nt; 96.1–96.5% aa). However, the deduced amino acid sequence of VP4 of the bat KE4852/07 strain showed the highest identity to human strain 6782 (96.4% nt; 97.3% aa), isolated in Cameroon in 2000 (Esona *et al.*, 2010). The high identities shared between human and bat strains were highlighted in the phylogenetic tree (Fig. 4).

Comparison of the IAL-RN376 and IAL-RN377 VP4 sequences showed that they were also related to the same bat RVA strain KE4852/07, sharing an identity of 94.7% (95% aa) and 94.6% (94.2% aa) at the nucleotide level,

respectively. When the strains IAL-RN376 and IAL-RN377 and Brazilian human strains HST435 and HST369 were compared with each other, similarities of 96.4–96.5% nt (96.9–97.6% aa) were revealed. The VP4 sequences of human strains IAL-RN376 and IAL-RN377 were also compared with those of strains representing porcine P[6] types (BRA898/07 and Gottfried), and the nucleotide identities ranged from 80 to 87.9% (80–89.2% aa) (Fig. 4).

On the basis of the VP4 phylogenetic tree, the five different lineages described previously (Martella *et al.*, 2006) were identified, i.e. Lineages I–V (Fig. 4). Strains IAL-RN376 and IAL-RN377 clustered in Lineage I. Lineage I consisted exclusively of human strains isolated from several countries, except for the bat strain KE4852/07 isolated in Kenya in 2007. Lineage II comprised a single porcine strain (Gottfried) isolated in the USA in 1975. Lineage III consisted of two porcine strains (JP3-6 and JP29-6) from Japan. Lineage IV was occupied by human strains isolated in Hungary (BP1198/98, BP1338/99 and BP271/00). Lineage V consisted exclusively of porcine strains isolated in Italy in 2004. Curiously, the porcine strain BRA898/07 detected in Brazil in 2007 did not cluster in any lineage (Fig. 4).

Comparative analysis of the deduced amino acid sequences of the fragment of VP6 known to correlate subgroup (SG) specificity (Iturriza-Gómara *et al.*, 2002) allowed characterization of strains IAL-RN376 and IAL-RN377 as genogroup I (SGI) (data not shown). Phylogenetic analysis of the VP6 genes revealed that strains IAL-RN376 and IAL-RN377 clustered within I2, which is typical of strains belonging to the DS-1 genome constellation (Nakagomi *et al.*, 1989). The VP6 gene of strains IAL-RN376 and IAL-RN377 share high nucleotide identities of 93.5–98.5% (80.9–96% aa) with those of human I2 strains, and 99.1% (97% aa) between them. Although strains IAL-RN376 and IAL-RN377 were assigned to the I2 genotype, the VP6 gene of strains IAL-RN376 and IAL-RN377 exhibited extremely low nucleotide and amino acid sequence identities (83.2–83.8% nt; 54.3–54.9% aa) to the prototype strain DS-1, and clustered separately by phylogenetic analysis (Fig. 5).

Strains IAL-RN376 and IAL-RN377 also shared moderately high nucleotide identities with three bovine RVA I2 strains: RUBV81 (90.9–91.2% nt; 72.1–72.5% aa) and 86 (90.3–90.6% nt; 71.4–71.8% aa) isolated in India, and KJ9-1 (91.7–92% nt; 75–75.4% aa) isolated in South Korea. In addition, moderate nucleotide identities were observed between strains IAL-RN376 and IAL-RN377 and the porcine strain HP140 I2 detected in India (90–90.3% nt; 70.1–70.5% aa). The VP6 genes of strains IAL-RN376 and IAL-RN377 clustered with strain B1711 isolated in Belgium in 2002 (97.6–98.2% nt; 93.2–96% aa), strain 272-BF isolated in Burkina Faso in 2010 (97.3–98.2% nt; 92.2–95% aa) and strain 06-242 isolated in the USA in 2006 (97.6–98.5% nt; 93.2–96% aa), all previously described human RVA P[6] strains (Fig. 5).

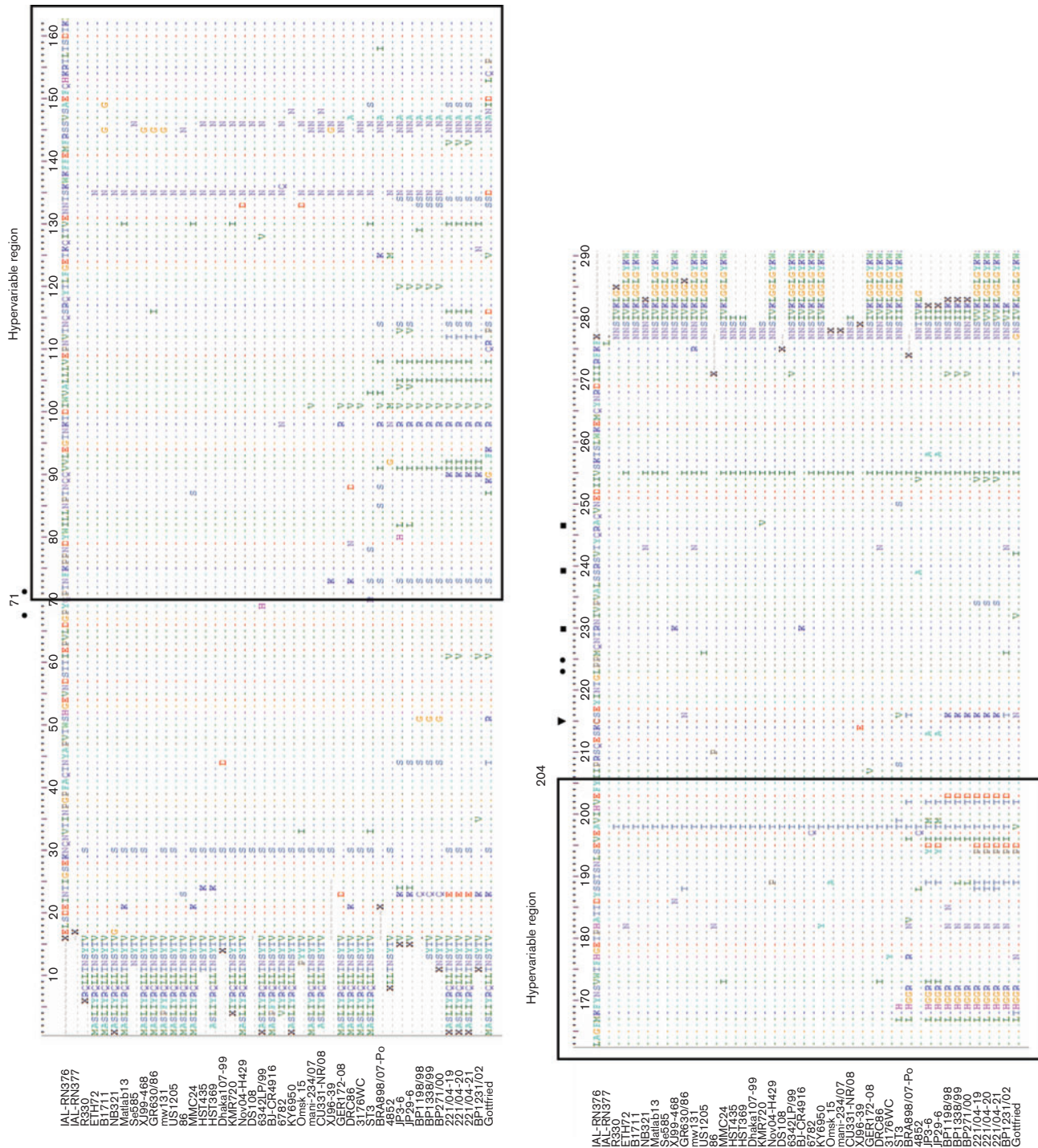


Fig. 3. Deduced amino acid sequence of the VP8* trypsin cleavage product of the VP4 protein of human strains IAL-RN376 and IAL-RN377 and of a selection of P[6] rotaviruses. The hypervariable region (aa 71–204), and the highly conserved cysteine (▼), proline (●) and arginine (■) are indicated. Species and isolate of each strain are indicated.

The bat RVA strain KE4852/07 belongs to a novel VP6 genotype designated I15 (Esona *et al.*, 2010), and low sequence identities were found when compared with P[6] sequences of both animal and human origin (68.5–79.4 %

nt; 33.3–49 % aa). Comparison of the partial VP6 nucleotide and amino acid sequences of strains IAL-RN376 and IAL-RN377 with bat strain KE4852/07 also showed low levels of identity (76.8–77.1 % nt; 42.5–43.3 % aa) (Fig. 5).

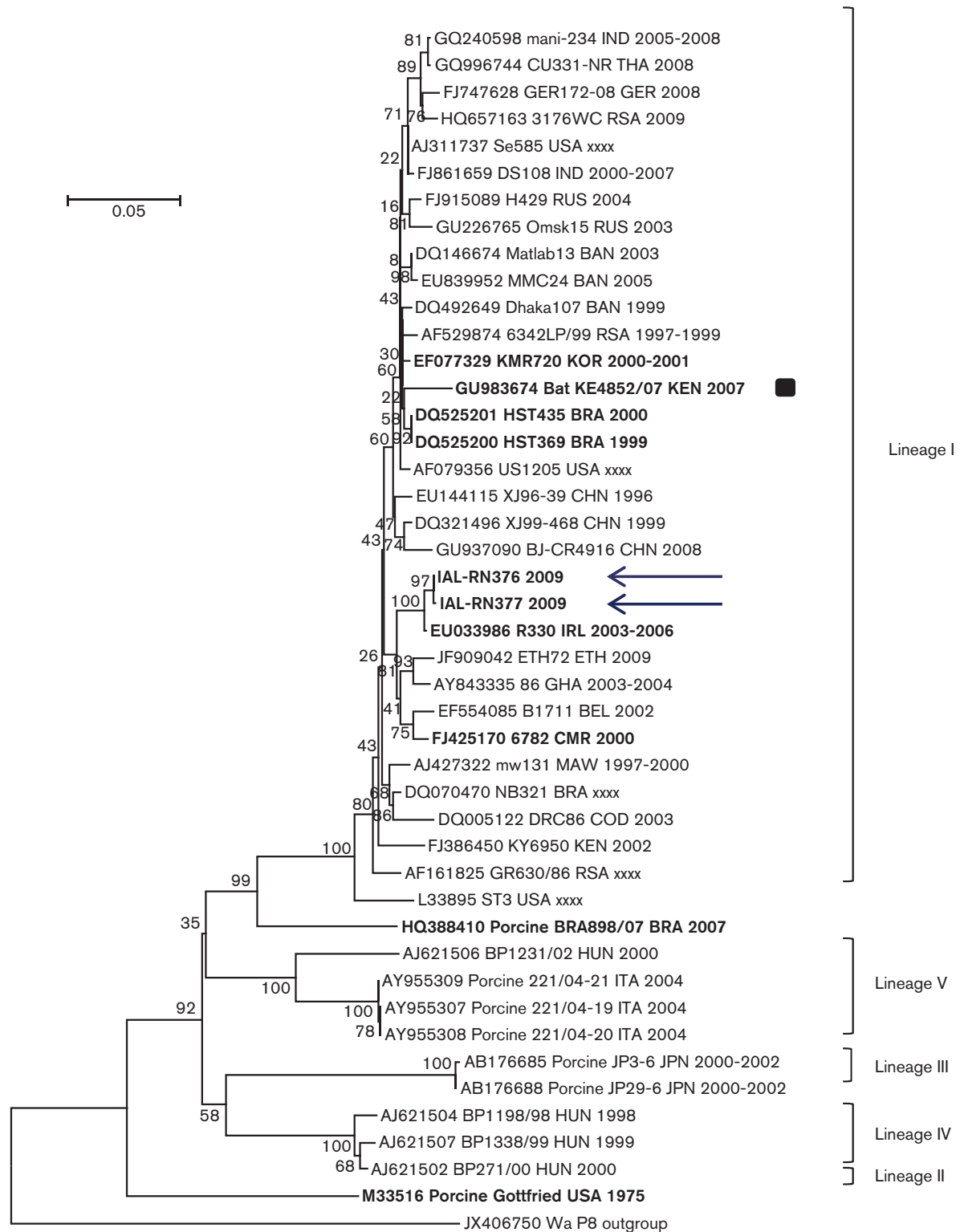


Fig. 4. Nucleotide-based phylogenetic relatedness of IAL-RN376 and IAL-RN377 RVA P[6] VP4 genes (indicated by the arrows) to other selected human and animal P[6] strains. The bat strain KE4852/07 (■) is indicated. The RVA strains of particular interest are highlighted in bold. The neighbour-joining tree of the partial VP4 nucleotide sequence was generated with MEGA 4. Reference P[6] strains were obtained from GenBank. Accession number, species, isolate, country and year are indicated for each strain. Roman numerals I–V represent five different lineages. The scale indicates the number of divergent nucleotide residues. Percentages of bootstrap values are shown at the branch nodes.

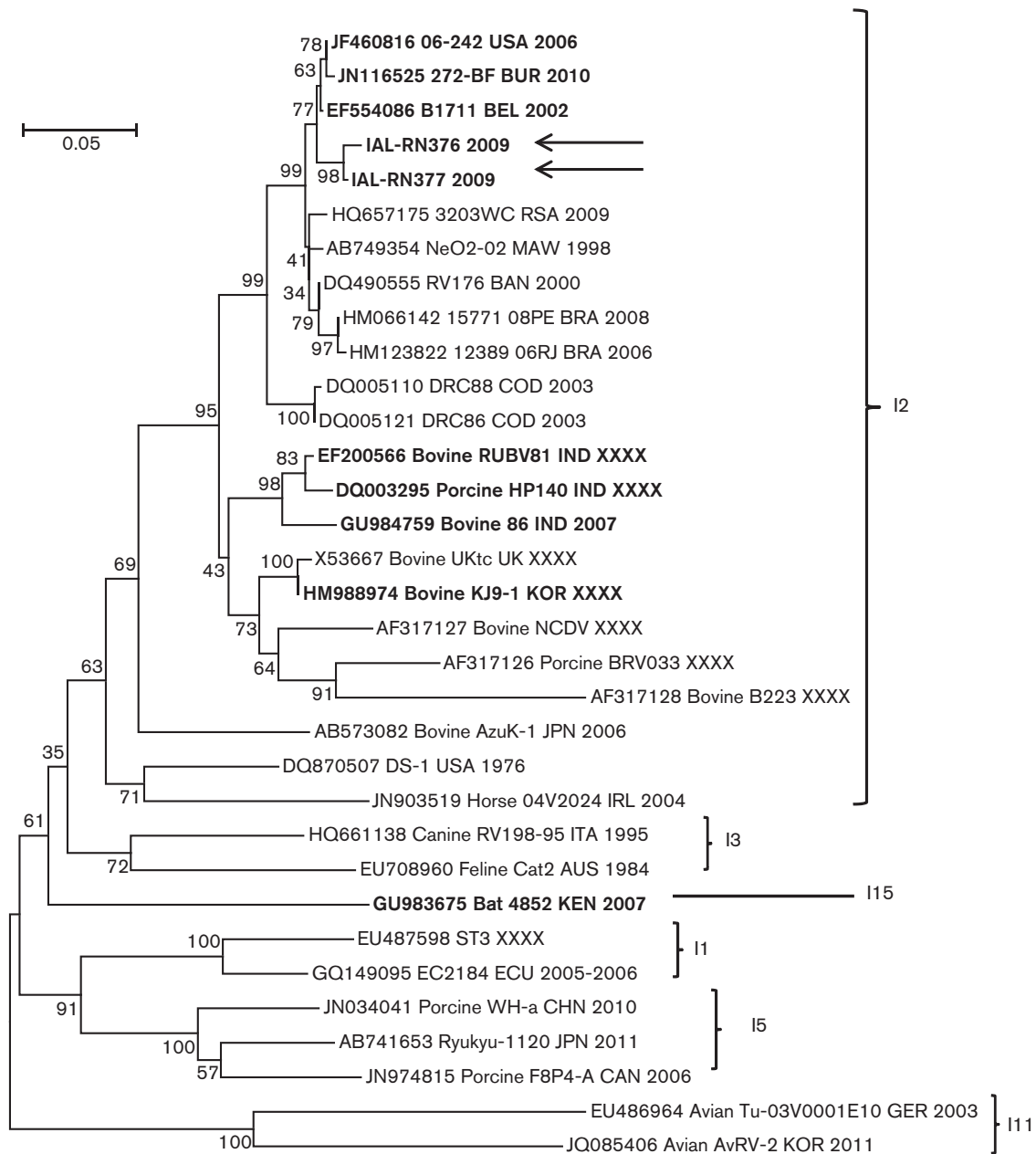


Fig. 5. Nucleotide-based phylogenetic relatedness of IAL-RN376 and IAL-RN377 RVA I2 VP6 genes (indicated by the arrows) to other selected human and animal VP6 strains. The RVA strains of particular interest are highlighted in bold. The neighbour-joining tree of the partial VP6 nucleotide sequence was generated with MEGA 4. Reference VP6 I1, I2, I3, I5, I11 and I15 strains were obtained from GenBank. Accession number, species, isolate, country and year are indicated for each strain. The scale indicates the number of divergent nucleotide residues. Percentages of bootstrap values are shown at the branch nodes.

DISCUSSION

The present study detected human RVA strains with unusual G8P[6] combinations in Brazilian Indian children with acute gastroenteritis. Human genotype G8 strains have been reported globally, including in Europe (Cooney *et al.*, 2001), South America (Santos *et al.*, 1998; Montenegro *et al.*, 2007; Gómez *et al.*, 2010), Australia

(Bishop *et al.*, 2001) and Asia (Kang *et al.*, 2002). However, in Africa, they are of epidemiological importance and have been reported at frequencies as high as the globally common G3 or G4 strains (Gentsch *et al.*, 2005; Santos & Hoshino, 2005; Page *et al.*, 2010).

This study demonstrated that the G8 Brazilian strain IAL-RN376 shared a high level of RNA homology with

Democratic Republic of Congo strains (Matthijssens *et al.*, 2006). The close relationship between Brazilian and African G8 strains had already been observed previously (Montenegro *et al.*, 2007; Gómez *et al.*, 2010; Page *et al.*, 2010). The Brazilian and African populations have always been interconnected due to a significant immigration flow (Gómez *et al.*, 2010), including the forced migration (slave trade) during the nineteenth century, leading to the exchange of RVA strains (Gómez *et al.*, 2010). Nevertheless, the question of how these strains were transported from one continent to another, e.g. by international air travel, imported or exported food, animal products (Page *et al.*, 2010) and infected children during the incubation period, remains unresolved.

The G8 genotype also has a wide distribution in animal species, and has been reported in pigs, horses and cattle (Cooney *et al.*, 2001; Cao *et al.*, 2009). Therefore, the origin of G8 strains in the human population has been investigated in recent years and interspecies transmission from a bovine source has been suggested (Adah *et al.*, 2003; Matthijssens *et al.*, 2006; Cao *et al.*, 2009; Esona *et al.*, 2009; Ghosh *et al.*, 2011). Comparative sequence analyses showed that the Brazilian G8 strain IAL-RN376 displays a close genetic relationship to the bovine African G8 strain NGRBg8. In fact, human African G8 RVA strains DRC88 and DRC86 also showed nucleotide sequence identity with the same bovine G8 strain NGRBg8 (Matthijssens *et al.*, 2006). The available data on circulating bovine RVA strains in Brazil have indicated the G8 genotype in herds in the Midwest region (Alfieri *et al.*, 2004). Indigenous populations and animals often share the same source of water, increasing the chance of animal–human transmission. Therefore, it was not too surprising to detect genotype G8 strains, known to circulate in bovine herds, in Brazilian indian children living in this region. Unfortunately, none of the animals from the sampling site were screened for the presence of RVA.

In addition, strain IAL-RN376 G8 displayed a close genetic relationship with the simian G8 strain KY1646. However, strain KY1646 did not have an animal origin. This strain was collected from a vervet monkey (V1888) infected experimentally with an unpassaged RVA strain obtained from the stool of a 6-year-old child (JMM-9/11) hospitalized with acute gastroenteritis at MP Shan Hospital in Nairobi, Kenya in 1999 (Chege *et al.*, 2005). G8 strains with animal genetic characteristics are rare and do not persist for long periods in human populations (Page *et al.*, 2010).

The potential VP7 N-linked glycosylation site was located at aa 69 in strain IAL-RN376, which tends to be conserved among RVA strains (Martella *et al.*, 2003). In addition, human strain IAL-RN376 had a second potential glycosylation site at aa 238, like most bovine and human G8 strains (Gouvea *et al.*, 1990; Okada & Matsumoto, 2002). Glycosylation of residue 238 could have far-ranging effects on the immunogenicity, and has previously been shown to reduce neutralization of animal G11 RVA strains by hyperimmune sera and MAbs (Ciarlet *et al.*, 1997).

The amino acid substitution at position 146^{T→V} occurred inside the major antigenic site, region D (aa 143–152). The amino acid substitution at position 218^{A→T} occurred inside region E (aa 207–220), which is spatially very close to region D (Estes & Kapikian, 2007). The precise impact of amino acid changes cannot be predicted from sequence information alone (Zeller *et al.*, 2012) and studies attempting to correlate intragenotypic nucleotide differences with antigenic differences are extremely important (Jin *et al.*, 1996; Hoshino *et al.*, 2004).

Human RVA G8 strains have been found to be associated with a variety of VP4 genotypes, including P[1], P[2], P[4], P[5], P[6], P[8], P[10], P[11] and P[14] (Qian & Green, 1991; Gerna *et al.*, 1994; Cunliffe *et al.*, 1999; Fukai *et al.*, 1999; Fischer *et al.*, 2000; Jagannath *et al.*, 2000; Adah *et al.*, 2001; Kang *et al.*, 2002; Okada & Matsumoto, 2002; Matthijssens *et al.*, 2006; Page *et al.*, 2010). The ability of RVA strains to reassort freely was also noted for genotype G9 strains (Laird *et al.*, 2003). G8 strains have also shown the ability to reassort repeatedly with RVA strains more ecologically suited to the human gut, i.e. with P[4], P[6] and P[8] specificity (Page *et al.*, 2010). Nonetheless, the fact that genotypes such as G8P[4], G8P[6] and G8P[8] do not remain in circulation suggests that these binary associations may not achieve the fitness required to become a successful human pathogen in some countries, except Africa (Esona *et al.*, 2009; Gómez *et al.*, 2010).

The P[6] genotype has been associated with unusual or novel RVA strains, emerging in naïve populations (Aminu *et al.*, 2010), and it has been speculated that reassortment with the P[6] genotype may provide a mechanism to establish a previously rare G type into a naïve population (Page *et al.*, 2010). Owing to the availability of new sequence data in GenBank, the VP4 gene analysis allowed us to identify a close genetic relationship between African bat KE4852/07 (Esona *et al.*, 2010) and human IAL-RN376 and IAL-RN377 P[6] strains detected in this study. The bat strain KE4852/07 (Esona *et al.*, 2010) was also closely related to strains HST435 and HST369 isolated from neonates in the city of Belem, in the Northern region of Brazil (Mascarenhas *et al.*, 2007). The finding that the bat strain KE4852/07 was nearly identical to human P[6] was described previously by Esona *et al.* (2010). Bats are being recognized increasingly as reservoir hosts for viruses that can cross species barriers to infect humans and other domestic animals and wild mammals (Calisher *et al.*, 2006; Halpin *et al.*, 2011; Cui *et al.*, 2012; Fagrouch *et al.*, 2012; Marsh *et al.*, 2012; Quan *et al.*, 2013; Smith & Wang, 2013). Fruit bats often live near human habitats (Calisher *et al.*, 2006), and there are various opportunities for bats and humans to come into contact with each other and their respective RVA (Esona *et al.*, 2010). In indian villages, contact between humans and bats can be even more frequent (Smith & Wang, 2013).

Trypsin cleavage of the VP4 spike protein, which yields two polypeptides, VP8* and VP5*, is required for the activation

of infectivity (Estes *et al.*, 1981; Gorziglia *et al.*, 1988). The potential VP4 arginine cleavage sites (230, 240 and 246) were maintained in strains IAL-RN376 and IAL-RN377, ensuring infectivity. The four proline residues (68, 71, 224 and 225) are conserved in strains IAL-RN376 and IAL-RN377. These conserved prolines may have a major influence on the conformation of VP4, because proline is known to distort the three-dimensional structure (Gorziglia *et al.*, 1988).

In the study presented here, the analysis of VP6 gene sequences revealed the presence of genogroup I. In general, SGI RVA strains were associated with the P[6] or P[4] genotypes, and SGII RVA strains were associated with the P[8] genotype, demonstrating a gene-dependent co-segregation pattern (Iturriza-Gómara *et al.*, 2002; Nordgren *et al.*, 2012a, b). We further observed that the VP6 genes of the unusual G8P[6] RVA strains were related closely to VP6 genes of two rare G6P[6] strains: strain B1711 isolated in Belgium in 2002 in a child arriving from Mali (Rahman *et al.*, 2003; Matthijssens *et al.*, 2008c) and the strain 272-BF isolated in Burkina Faso in 2010 (Nordgren *et al.*, 2012a, b). In addition, the 06-242 strain G2P[6] RVA genotype isolated in the USA in 2006 (Clark *et al.*, 2011; Heylen *et al.*, 2013) was also phylogenetically closely related to strains IAL-RN376 and IAL-RN377, as well as the B1711 and 272-BF G6P[6] RVA strains. This observation could indicate a genetic linkage between VP6 genes from the African and American continents, reinforcing the close relationship observed between Brazilian and African G8 strains. However, to answer this kind of question in the future, it is important that more sequence information on RVA strains from developing countries becomes available (Heylen *et al.*, 2013).

A significant genetic relatedness of human and animal RVA was also observed in the VP6 gene. Strains IAL-RN376 and IAL-RN377 appeared to share a more common origin with bovine (RUBV81, 86 and KJ9-1; nucleotide sequence identities of 90.3–92%) and porcine (HP140; nucleotide sequence identities of 90–90.3%) strains than the prototype human strain DS-1 (nucleotide sequence identities of 83.2–83.8%). Artiodactyl-like human VP6 strains linked to the RVA P[6] genotype have been reported previously in asymptomatic neonates (Ghosh *et al.*, 2013). In addition, it has been speculated that several gene segments of bovine RVA strains, including VP6, have a common ancestor with human DS-1-like RVA strains (Matthijssens & Van Ranst, 2012).

Lineages among G8 and P[6] strains had already been recognized previously (Fukai *et al.*, 2004; Martella *et al.*, 2006; Pietsch *et al.*, 2009) and, based on the phylogenetic tree, the animal host origin of G8 and P[6] genotypes can be suggested as likely if animal strains are located at the base of the dendrogram. Based on the dendrogram and the amino acid substitutions within variable regions, subclassification of G8 RVA into six different lineages was proposed in the present study. The present data concur

with the classification suggested previously by Fukai *et al.* (2004) (lineages G8a, G8b, G8c and G8d). In contrast, the subclassification proposed by Pietsch *et al.* (2009) did not comprise any of the G8 lineages observed. In this study, three human strains clustered within the G8 Lineage III (G8c), together with bovine strain 678; four human strains clustered within the G8 Lineage V (G8d), together with bovine strain A5; and 14 human strains clustered within the G8 Lineage VI (not described), together with bovine strain NGRBg8. This is suggestive strongly of a common evolutionary origin of the G8 human and bovine RVAs, and may represent a recent interspecies transmission event between cattle and humans that occurred independently from the event leading to the onset of the G8 Lineage I (G8b). More extensive sequence analysis of G8 strains is needed to establish the lineages correctly.

Martella *et al.* (2006) and Mascarenhas *et al.* (2007) found some similarities between human and porcine P[6] RVA strains. In the present study, human P[6] samples did not cluster with porcine strains, exhibiting more similarity to other human strains (Lineage VI). In fact, human P[6] strains, including strains IAL-RN376 and IAL-RN377, clustered with the bat strain KE4852/07, suggesting that such strains share a common evolutionary origin (Esona *et al.*, 2010). Additional sequence analysis of human and animal P[6] strains could help clarify the true origin of the zoonotic strains circulating in humans.

Based on this study, it is speculated that a reassortment event between bovine G8 and bat P[6] RVA may have occurred in the animal host(s) preceding the transmission to the human host (Esona *et al.*, 2010). However, recent findings suggest strongly that the P[6] strain had a porcine origin (Martella *et al.*, 2006; Matthijssens *et al.*, 2006) and that humans may have served as a reservoir of transmission of P[6] RVA strains to bats, which can result in anthroponozoonotic transmission of RVA genes (Esona *et al.*, 2010). Taken together, these observations suggest that strains IAL-RN376 and IAL-RN377 might be derived from anthroponozoonotic transmission; however, with the currently available data it is not possible to confirm the exact direction of these transmission events or to determine unequivocally the origin of these unusual genotypes found in humans (Steyer *et al.*, 2010). It is important to note that the uncommon G8P[6] strains analysed in this study were detected in Brazilian Indian children; in the indigenous population, interspecies transmission is probably fairly frequent as many of the inhabitants live under conditions of poor hygiene, in close proximity with animals, and often share a common source of drinking water. Moreover, children could be more exposed to infection than adults because of their close interactions with pets together with limited hygiene habits characteristic of their age.

The representative isolates, IAL-RN376 and IAL-RN377, had a high level of identity with strains I2 (B1711, 272-BF, 06-242) and G8 (DRC86, DRC88) belonging to the DS-1 genogroup (Matthijssens *et al.*, 2006, 2008c; Nordgren

et al., 2012a, b; Heylen *et al.*, 2013), suggesting that G8P[6] strains from Brazil belong to viruses of the DS-1 gene constellation. However, genetic characterization of additional genes is necessary to determine the full genetic profile of these strains. Indeed, the determination of complete sequences from all genes, as recommended by the Rotavirus Classification Working Group (Matthijssens *et al.*, 2008a, b), would have permitted more thorough analyses of sequence data (Esona *et al.*, 2011). The VP6 protein is classified currently into 16 I genotypes (He *et al.*, 2013). It is important to note that the VP6 protein of the bat RVA strain KE4852/07 strain was characterized as a novel VP6 genotype, designated I15 (Esona *et al.*, 2010). Strain KE4852/07 is also the only currently known RVA strain with the I15 genotype. More recently, a G3P[3] strain (MSLH14 strain) was detected from a lesser horseshoe bat (*Rhinolophus hipposideros*) in China (He *et al.*, 2013). Strain MSLH14 was classified into the I8 genotype and is currently the third known RVA strain with this VP6 genotype (He *et al.*, 2013).

An important limitation of the RVA genomics study between animal and potential zoonotic human cases is presenting: epidemiological background information on potential contact with animals is not generally available nor are animal RVA strains from the area where these patients lived during their illness (Bányai *et al.*, 2010). The present study is no exception and predicting the zoonotic event of a particular RVA strain relies currently only on phylogenetic evidence (Bányai *et al.*, 2010).

In 2006, an attenuated G1P[8] vaccine (Rotarix) was included in the Brazilian Immunization Programme, preventing severe RVA gastroenteritis and inducing a significant reduction in the frequency of RVA detection in children with gastroenteritis (Gurgel *et al.*, 2008). As both VP7 and VP4 play roles in protective immunity (Kapikian *et al.*, 2001; Estes & Kapikian, 2007), knowledge of the distribution of G and P types, including the detection of emerging serotypes, is critical for establishing RVA vaccine programmes (Montenegro *et al.*, 2007). It worth mentioning that other RVA proteins, VP2, VP6, NSP2 and NSP4 epitopes (antibody against which are not neutralizing), are immunogenic and antibodies directed against them are found in most serum samples from convalescing individuals. However, the clinical significance of non-neutralizing RVA-specific antibodies for protection has not been explored fully (Desselberger & Huppertz, 2011). In addition, although a large genetic diversity exists among RVA with respect to the G/P genotypes, the diversity is much smaller on the level of complete genomes, and only Wa and DS-1-like RVA strains are of significant epidemiological importance in humans (Glass *et al.*, 2013; Parashar *et al.*, 2013).

G8 strains had been detected in Brazil before the introduction of the RVA vaccine (Santos *et al.*, 1998; Volotão *et al.*, 2006; Montenegro *et al.*, 2007), and its important to continue with surveillance studies in the country to have a better understanding of whether such

strains represent emerging genotypes, as in some African countries, and whether this should be taken into account in future vaccine developments. In a recent study conducted by Steele *et al.* (2012), the Rotarix vaccine demonstrated efficacy against severe gastroenteritis caused by diverse circulating RVA types sharing neither G nor P type with the vaccine strain (dually heterotypic RVA types), including G8 specificity (64.4%). In addition, the prevalence of the P[6] genotype, in particular within the context of the DS-1-like genotype constellation, needs to be monitored closely because the success of vaccination programmes can be influenced by the genetic heterogeneity of human RVA strains. Neither of the currently licensed RVA vaccines (Rotarix and RotaTeq) contain strains with the P[6] genotype or strains with the complete DS-1-like genotype constellation (Matthijssens & Van Ranst, 2012; Heylen *et al.*, 2013).

In conclusion, the findings of this study reinforce the theory that there is a important interaction between RVA of human and animals. Zoonotic studies are hampered by a lack of genome sequencing data of RVA circulating in animals (Jere *et al.*, 2012) and this is especially the case for Brazil. Simultaneous surveillance of animal (including wildlife) and human RVA infections (Martella *et al.*, 2006; Steyer *et al.*, 2008), and accumulation of more sequence data of animal strains (Jere *et al.*, 2012) are vital for the understanding of the ecology, epidemiology and evolution of these viruses.

METHODS

Faecal samples. Stool samples from patients with acute gastroenteritis were sent to the Enteric Diseases Laboratory of the Adolfo Lutz Institute, regional reference centre for RVA surveillance, Brazil Ministry of Health, and a member of the Acute Diarrhoea Disease Monitoring Programme (ADDMP), State of São Paulo Department of Health. The aim of the ADDMP is the early detection of diarrhoea outbreaks with a national scope. The samples studied were part of the ADDMP and were detected during 2009 national RVA surveillance (January–December) in Brazilian native children ≤ 3 years with acute gastroenteritis (Table 1).

This study was carried out with convenient surveillance specimens, without inclusion or exclusion criteria, and with no characterization of the participating Brazilian indian communities. The molecular characterization of RVA genotypes post-Rotarix vaccination was performed without clinical evaluation and the information on RVA vaccination was obtained from medical records. Therefore, the study does not allow assessment of security, immunogenicity or protection provided by vaccination.

The indian communities were located in the city of Dourados, a municipality of the state of Mato Grosso do Sul, Midwest region, Brazil. Dourados lies near the border with Paraguay (~120 km) and 235 km distant from the state capital (Campo Grande). The main economic activity of the Midwest region is cattle ranching, accounting for ~36% of national production, and the region has the largest herd in Brazil. Beef cattle are the most important, although there are also dairy cattle in the states of the Midwest region (<http://www.brasilecola.com/brasil/pecuaria-na-regiao-centrooeste.htm>).

The state of Mato Grosso do Sul has a large indigenous population that belongs to eight different ethnic groups: Guarani, Kaiowa,

Terena, Kadiwéu, Kinikinau, Guató, Ofaié and Atikum (Ferreira *et al.*, 2011). The city of Dourados was inhabited previously by Terena, Kaiowa and Guarani ethnicities. However, they were displaced in the 1950s due to agriculture and livestock expansion (<http://www.ibge.gov.br/home/>). Nowadays, there are two indian reservations in the city of Dourados. The Dourados Indian Reservation ('Terra Indígena Dourados') was created in 1984, with 3475 ha, located only 5 km from the city centre, and with 11 000 native inhabitants. The native population are unable to make their living from the land due to lack of sufficient area and appropriate means. The Reservation does not offer hunting and fishing for the inhabitants. In addition, the Reservation is surrounded by large soya plantations and the few natural sources of water are contaminated by urban sewage or pesticides. In 2004, the Panambizinho Reservation was created, located 23 km from the city centre, with 1180 ha, and a current population of 650 native inhabitants (<http://www.cpao.embrapa.br/portal/artigos/artigos/artigo17.html>, <http://www.ibge.gov.br/home/>).

Rotavirus detection. A total of 68 stool samples (collected from January to December 2009) were tested for RVA using a commercial immunoenzymic assay (RIDASCREEN Rotavirus; R-Biopharm), performed according to the manufacturer's instructions.

PAGE. The RVA migration profiles were analysed by PAGE followed by silver staining of gels (Herring *et al.*, 1982).

Genotyping VP7, VP4 and VP6. RVA dsRNA was extracted by the QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen) following the manufacturer's instructions. RT-PCRs for the VP7, VP4 and VP6 genes were performed according to the protocols described previously (Gouvea *et al.*, 1990, 1994; Gentsch *et al.*, 1992; Iturriza-Gómora *et al.*, 2002).

Nucleotide sequencing and analysis. PCR amplicons were sequenced using the BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) with primers Beg9/End9 for the VP7 gene (1062 bp), Con2/Con3 for the VP4 gene (876 bp) and VP6-F/VP6-R for the VP6 gene (379 bp). Dye-labelled products were sequenced using an ABI 3130 sequencer (Applied Biosystems). Sequencing chromatograms were edited manually using Sequencher 4.7 software. The web-based automated RVA genotyping tool RotaC^{2.0} (<http://rotac.regatools.be>) was used to assign the genotype of the study strains (Maes *et al.*, 2009). Sequences generated by manual editing and a set of cognate sequences of human and animal RVA available in GenBank were aligned using the BioEdit sequence alignment editor (version 7.0.5.2) program. Genetic and protein sequence analyses were performed using BioEdit and MEGA 4 (Tamura *et al.*, 2007). Distance matrices were constructed using BioEdit at the nucleotide and amino acid levels to evaluate percentage identity between strains. The Kimura two-parameter substitution model and neighbour-joining method was chosen within MEGA 4 to infer phylogenetic relationships among relevant strains. Nucleotide sequences determined in this study have been deposited in GenBank under the accession numbers JQ693565 for the VP7 gene, JQ693566/JQ693567 for the VP4 gene and KF718287/KF718288 for the VP6 gene.

Ethical approval. Previous Ethics Committee approval was granted by Adolfo Lutz Institute, São Paulo, Brazil (14/05 and 53/05). This was an anonymous unlinked study and informed consent was not required according to resolution 196/96 concerning research involving humans (Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde, Brasília, 1996).

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the staff of the Enteric Diseases Laboratory of Adolfo Lutz Institute: Rita de Cássia C. Carmona for laboratory supervision;

Audrey Cilli, Carolina J. Gill, Cibele D. Ribeiro and Simone G. Morillo for laboratory assistance; and Antonio Erculiani Junior and Sirlene Henrique Rodrigues Silva for technical assistance. We are grateful to the Public Health Laboratories (LACENs) and CGLAB/DEVEP/SVS/Ministry of Health, Brasília for assistance in sample collection and epidemiological data.

REFERENCES

- Adah, M. I., Wade, A. & Taniguchi, K. (2001). Molecular epidemiology of rotaviruses in Nigeria: detection of unusual strains with G2P[6] and G8P[1] specificities. *J Clin Microbiol* **39**, 3969–3975.
- Adah, M. I., Nagashima, S., Wakuda, M. & Taniguchi, K. (2003). Close relationship between G8-serotype bovine and human rotaviruses isolated in Nigeria. *J Clin Microbiol* **41**, 3945–3950.
- Alfieri, A. F., Alfieri, A. A., Barreiros, M. A., Leite, J. P. & Richtzenhain, L. J. G. (2004). G and P genotypes of group A rotavirus strains circulating in calves in Brazil, 1996–1999. *Vet Microbiol* **99**, 167–173.
- Aminu, M., Page, N. A., Ahmad, A. A., Umoh, J. U., Dewar, J. & Steele, A. D. (2010). Diversity of rotavirus VP7 and VP4 genotypes in Northwestern Nigeria. *J Infect Dis* **202** (Suppl.), S198–S204.
- Bányai, K., Esona, M. D., Mijatovic, S., Kerin, T. K., Pedreira, C., Mercado, J., Balmaseda, A., Perez, M. C., Patel, M. M. & Gentsch, J. R. (2009). Zoonotic bovine rotavirus strain in a diarrheic child, Nicaragua. *J Clin Virol* **46**, 391–393.
- Bányai, K., Papp, H., Dandár, E., Molnár, P., Mihály, I., Van Ranst, M., Martella, V. & Matthijssens, J. (2010). Whole genome sequencing and phylogenetic analysis of a zoonotic human G8P[14] rotavirus strain. *Infect Genet Evol* **10**, 1140–1144.
- Bishop, R. F., Masendycz, P. J., Bugg, H. C., Carlin, J. B. & Barnes, G. L. (2001). Epidemiological patterns of rotaviruses causing severe gastroenteritis in young children throughout Australia from 1993 to 1996. *J Clin Microbiol* **39**, 1085–1091.
- Calisher, C. H., Childs, J. E., Field, H. E., Holmes, K. V. & Schountz, T. (2006). Bats: important reservoir hosts of emerging viruses. *Clin Microbiol Rev* **19**, 531–545.
- Cao, D., Igboeli, B., Yuan, L., Kapikian, A. Z., Ayers, J. L., Abinanti, F. R. & Hoshino, Y. (2009). A longitudinal cohort study in calves evaluated for rotavirus infections from 1 to 12 months of age by sequential serological assays. *Arch Virol* **154**, 755–763.
- Carmona, R. C., Timenetsky, M. C., da Silva, F. F. & Granato, C. F. (2004). Characterization of rotavirus strains from hospitalized and outpatient children with acute diarrhoea in São Paulo, Brazil. *J Med Virol* **74**, 166–172.
- Carmona, R. C., Timenetsky, M. C., Morillo, S. G. & Richtzenhain, L. J. (2006). Human rotavirus serotype G9, São Paulo, Brazil, 1996–2003. *Emerg Infect Dis* **12**, 963–968.
- Chege, G. K., Steele, A. D., Hart, C. A., Snodgrass, D. R., Omolo, E. O. & Mwenda, J. M. (2005). Experimental infection of non-human primates with a human rotavirus isolate. *Vaccine* **23**, 1522–1528.
- Ciarlet, M., Hoshino, Y. & Liprandi, F. (1997). Single point mutations may affect the serotype reactivity of serotype G11 porcine rotavirus strains: a widening spectrum? *J Virol* **71**, 8213–8220.
- Clark, H. F., Lawley, D., DiStefano, D., Maliga, M., Kilby, B., Kulnis, G., Mallette, L. & DiNubile, M. J. (2011). An unusual outbreak of rotavirus genotype G2P[6] during the 2005–2006 epidemic season in Philadelphia. *Diagn Microbiol Infect Dis* **70**, 218–222.
- Cook, N., Bridger, J., Kendall, K., Gomara, M. I., El-Attar, L. & Gray, J. (2004). The zoonotic potential of rotavirus. *J Infect* **48**, 289–302.

- Cooney, M. A., Gorrell, R. J. & Palombo, E. A. (2001). Characterisation and phylogenetic analysis of the VP7 proteins of serotype G6 and G8 human rotaviruses. *J Med Microbiol* **50**, 462–467.
- Cui, J., Tachedjian, G., Tachedjian, M., Holmes, E. C., Zhang, S. & Wang, L. F. (2012). Identification of diverse groups of endogenous gammaretroviruses in mega- and microbats. *J Gen Virol* **93**, 2037–2045.
- Cunliffe, N. A., Gondwe, J. S., Broadhead, R. L., Molyneux, M. E., Woods, P. A., Bresee, J. S., Glass, R. I., Gentsch, J. R. & Hart, C. A. (1999). Rotavirus G and P types in children with acute diarrhea in Blantyre, Malawi, from 1997 to 1998: predominance of novel P[6]G8 strains. *J Med Virol* **57**, 308–312.
- De Grazia, S., Martella, V., Giammanco, G. M., Gòmara, M. I., Ramirez, S., Cascio, A., Colomba, C. & Arista, S. (2007). Canine-origin G3P[3] rotavirus strain in child with acute gastroenteritis. *Emerg Infect Dis* **13**, 1091–1093.
- Desselberger, U. & Huppertz, H. I. (2011). Immune responses to rotavirus infection and vaccination and associated correlates of protection. *J Infect Dis* **203**, 188–195.
- Esona, M. D., Geyer, A., Page, N., Trabelsi, A., Fodha, I., Aminu, M., Agbaya, V. A., Tsion, B., Kerin, T. K. & other authors (2009). Genomic characterization of human rotavirus G8 strains from the African Rotavirus Network: relationship to animal rotaviruses. *J Med Virol* **81**, 937–951.
- Esona, M. D., Mijatovic-Rustempasic, S., Conrardy, C., Tong, S., Kuzmin, I. V., Agwanda, B., Breiman, R. F., Banyai, K., Niezgoda, M. & other authors (2010). Reassortant group A rotavirus from straw-colored fruit bat (*Eidolon helvum*). *Emerg Infect Dis* **16**, 1844–1852.
- Esona, M. D., Banyai, K., Foytich, K., Freeman, M., Mijatovic-Rustempasic, S., Hull, J., Kerin, T., Steele, A. D., Armah, G. E. & Geyer, A. (2011). Genomic characterization of human rotavirus G10 strains from the African Rotavirus Network: relationship to animal rotaviruses. *Infect Genet Evol* **11**, 237–241.
- Estes, M. K. & Kapikian, A. Z. (2007). Rotaviruses. In *Fields Virology*, 5th edn, pp. 1917–1974. Edited by D. M. Knipe & P. M. Howley. Philadelphia, PA: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.
- Estes, M. K., Graham, D. Y. & Mason, B. B. (1981). Proteolytic enhancement of rotavirus infectivity: molecular mechanisms. *J Virol* **39**, 879–888.
- Fagrouch, Z., Sarwari, R., Lavergne, A., Delaval, M., de Thoisy, B., Lacoste, V. & Verschoor, E. J. (2012). Novel polyomaviruses in South American bats and their relationship to other members of the family Polyomaviridae. *J Gen Virol* **93**, 2652–2657.
- Ferreira, M. E., Matsuo, T. & Souza, R. K. (2011). Aspectos demográficos e mortalidade de populações indígenas do Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil [Demographic characteristics and mortality among indigenous peoples in Mato Grosso do Sul State, Brazil]. *Cad Saude Publica* **27**, 2327–2339.
- Fischer, T. K., Steinsland, H., Molbak, K., Ca, R., Gentsch, J. R., Valentiner-Branth, P., Aaby, P. & Sommerfelt, H. (2000). Genotype profiles of rotavirus strains from children in a suburban community in Guinea-Bissau, Western Africa. *J Clin Microbiol* **38**, 264–267.
- Fukai, K., Sakai, T., Hirose, M. & Itou, T. (1999). Prevalence of calf diarrhea caused by bovine group A rotavirus carrying G serotype 8 specificity. *Vet Microbiol* **66**, 301–311.
- Fukai, K., Onoda, H., Itou, T., Sato, M., Miura, Y. & Sakai, T. (2004). Genetic and serological characterization of novel serotype G8 bovine group A rotavirus strains isolated in Japan. *J Vet Med Sci* **66**, 1413–1416.
- Gentsch, J. R., Glass, R. I., Woods, P., Gouvea, V., Gorziglia, M., Flores, J., Das, B. K. & Bhan, M. K. (1992). Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* **30**, 1365–1373.
- Gentsch, J. R., Laird, A. R., Bielfelt, B., Griffin, D. D., Banyai, K., Ramachandran, M., Jain, V., Cunliffe, N. A., Nakagomi, O. & other authors (2005). Serotype diversity and reassortment between human and animal rotavirus strains: implications for rotavirus vaccine programs. *J Infect Dis* **192** (Suppl 1), S146–S159.
- Gerna, G., Sears, J., Hoshino, Y., Steele, A. D., Nakagomi, O., Sarasini, A. & Flores, J. (1994). Identification of a new VP4 serotype of human rotaviruses. *Virology* **200**, 66–71.
- Ghosh, S., Gatheru, Z., Nyangao, J., Adachi, N., Urushibara, N. & Kobayashi, N. (2011). Full genomic analysis of a G8P[1] rotavirus strain isolated from an asymptomatic infant in Kenya provides evidence for an artiodactyl-to-human interspecies transmission event. *J Med Virol* **83**, 367–376.
- Ghosh, S., Urushibara, N., Chawla-Sarkar, M., Krishnan, T. & Kobayashi, N. (2013). Whole genomic analyses of asymptomatic human G1P[6], G2P[6] and G3P[6] rotavirus strains reveal inter-genogroup reassortment events and genome segments of artiodactyl origin. *Infect Genet Evol* **16**, 165–173.
- Glass, R. I., Parashar, U., Patel, M., Gentsch, J. & Jiang, B. (2013). Rotavirus vaccines: Successes and challenges. *J Infect*.
- Gómez, M. M., Volotão, E. M., de Mendonça, M. C., Tort, L. F., da Silva, M. F. & Leite, J. P. (2010). Detection of uncommon rotavirus A strains P[8]G8 and P[4]G8 in the city of Rio de Janeiro, 2002. *J Med Virol* **82**, 1272–1276.
- Gorziglia, M., Green, K., Nishikawa, K., Taniguchi, K., Jones, R., Kapikian, A. Z. & Chanock, R. M. (1988). Sequence of the fourth gene of human rotaviruses recovered from asymptomatic or symptomatic infections. *J Virol* **62**, 2978–2984.
- Gouvea, V., Glass, R. I., Woods, P., Taniguchi, K., Clark, H. F., Forrester, B. & Fang, Z. Y. (1990). Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *J Clin Microbiol* **28**, 276–282.
- Gouvea, V., de Castro, L., Timenetsky, M. C., Greenberg, H. & Santos, N. (1994). Rotavirus serotype G5 associated with diarrhea in Brazilian children. *J Clin Microbiol* **32**, 1408–1409.
- Gurgel, R. O., Correia, J. B. & Cuevas, L. E. (2008). Effect of rotavirus vaccination on circulating virus strains. *Lancet* **371**, 301–302.
- Halpin, K., Hyatt, A. D., Fogarty, R., Middleton, D., Bingham, J., Epstein, J. H., Rahman, S. A., Hughes, T., Smith, C. & other authors (2011). Pteropid bats are confirmed as the reservoir hosts of henipaviruses: a comprehensive experimental study of virus transmission. *Am J Trop Med Hyg* **85**, 946–951.
- He, B., Yang, F., Yang, W., Zhang, Y., Feng, Y., Zhou, J., Xie, J., Feng, Y., Bao, X. & other authors (2013). Characterization of a novel G3P[3] rotavirus isolated from a lesser horseshoe bat: a distant relative of feline/canine rotaviruses. *J Virol* **87**, 12357–12366.
- Herring, A. J., Inglis, N. F., Ojeh, C. K., Snodgrass, D. R. & Menzies, J. D. (1982). Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. *J Clin Microbiol* **16**, 473–477.
- Heylen, E., Zeller, M., Ciarlet, M., De Coster, S., Van Ranst, M. & Matthijnsens, J. (2013). Complete genetic characterization of human G2P[6] and G3P[6] rotavirus strains. *Infect Genet Evol* **13**, 27–35.
- Hoshino, Y., Jones, R. W., Ross, J., Honma, S., Santos, N., Gentsch, J. R. & Kapikian, A. Z. (2004). Rotavirus serotype G9 strains belonging to VP7 gene phylogenetic sequence lineage 1 may be more suitable for serotype G9 vaccine candidates than those belonging to lineage 2 or 3. *J Virol* **78**, 7795–7802.
- Iturriza-Gómara, M., Wong, C., Blome, S., Desselberger, U. & Gray, J. (2002). Molecular characterization of VP6 genes of human

- rotavirus isolates: correlation of genogroups with subgroups and evidence of independent segregation. *J Virol* **76**, 6596–6601.
- Iturriza-Gómara, M., Kang, G. & Gray, J. (2004).** Rotavirus genotyping: keeping up with an evolving population of human rotaviruses. *J Clin Virol* **31**, 259–265.
- Jagannath, M. R., Vethanayagam, R. R., Reddy, B. S., Raman, S. & Rao, C. D. (2000).** Characterization of human symptomatic rotavirus isolates MP409 and MP480 having ‘long’ RNA electropherotype and subgroup I specificity, highly related to the P6[1]G8 type bovine rotavirus A5, from Mysore, India. *Arch Virol* **145**, 1339–1357.
- Jere, K. C., Mlera, L., O’Neill, H. G., Peenze, I. & van Dijk, A. A. (2012).** Whole genome sequence analyses of three African bovine rotaviruses reveal that they emerged through multiple reassortment events between rotaviruses from different mammalian species. *Vet Microbiol* **159**, 245–250.
- Jin, Q., Ward, R. L., Knowlton, D. R., Gabbay, Y. B., Linhares, A. C., Rappaport, R., Woods, P. A., Glass, R. I. & Gentsch, J. R. (1996).** Divergence of VP7 genes of G1 rotaviruses isolated from infants vaccinated with reassortant rhesus rotaviruses. *Arch Virol* **141**, 2057–2076.
- Kang, G., Green, J., Gallimore, C. I. & Brown, D. W. (2002).** Molecular epidemiology of rotaviral infection in South Indian children with acute diarrhea from 1995–1996 to 1998–1999. *J Med Virol* **67**, 101–105.
- Kapikian, A. Z., Hoshino, Y. & Chanock, R. M. (2001).** Rotaviruses. In *Fields Virology*, 4th edn, vol. 2, pp. 1787–1833. Edited by D. M. Knipe & P. M. Howley. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins.
- Khamrin, P., Maneekarn, N., Peerakome, S., Yagyu, F., Okitsu, S. & Ushijima, H. (2006).** Molecular characterization of a rare G3P[3] human rotavirus reassortant strain reveals evidence for multiple human-animal interspecies transmissions. *J Med Virol* **78**, 986–994.
- Laird, A. R., Gentsch, J. R., Nakagomi, T., Nakagomi, O. & Glass, R. I. (2003).** Characterization of serotype G9 rotavirus strains isolated in the United States and India from 1993 to 2001. *J Clin Microbiol* **41**, 3100–3111.
- Luchs, A., Cilli, A., Morillo, S. G., Carmona, R. C. & Timenetsky, M. C. (2012).** Rare G3P[3] rotavirus strain detected in Brazil: possible human–canine interspecies transmission. *J Clin Virol* **54**, 89–92.
- Maes, P., Matthijnssens, J., Rahman, M. & Van Ranst, M. (2009).** RotaC: a web-based tool for the complete genome classification of group A rotaviruses. *BMC Microbiol* **9**, 238.
- Marsh, G. A., de Jong, C., Barr, J. A., Tachedjian, M., Smith, C., Middleton, D., Yu, M., Todd, S., Foord, A. J. & other authors (2012).** Cedar virus: a novel *Henipavirus* isolated from Australian bats. *PLoS Pathog* **8**, e1002836.
- Martella, V., Ciarlet, M., Pratelli, A., Arista, S., Terio, V., Elia, G., Cavalli, A., Gentile, M., Decaro, N. & other authors (2003).** Molecular analysis of the VP7, VP4, VP6, NSP4, and NSP5/6 genes of a buffalo rotavirus strain: identification of the rare P[3] rhesus rotavirus-like VP4 gene allele. *J Clin Microbiol* **41**, 5665–5675.
- Martella, V., Bányai, K., Ciarlet, M., Iturriza-Gómara, M., Lorusso, E., De Grazia, S., Arista, S., Decaro, N., Elia, G. & other authors (2006).** Relationships among porcine and human P[6] rotaviruses: evidence that the different human P[6] lineages have originated from multiple interspecies transmission events. *Virology* **344**, 509–519.
- Martella, V., Bányai, K., Matthijnssens, J., Buonavoglia, C. & Ciarlet, M. (2010).** Zoonotic aspects of rotaviruses. *Vet Microbiol* **140**, 246–255.
- Mascarenhas, J. D., Linhares, A. C., Gabbay, Y. B., Lima, C. S., Guerra, S. F., Soares, L. S., Oliveira, D. S., Lima, J. C., Macêdo, O. & Leite, J. P. (2007).** Molecular characterization of VP4 and NSP4 genes from rotavirus strains infecting neonates and young children in Belém, Brazil. *Virus Res* **126**, 149–158.
- Matthijnssens, J. & Van Ranst, M. (2012).** Genotype constellation and evolution of group A rotaviruses infecting humans. *Curr Opin Virol* **2**, 426–433.
- Matthijnssens, J., Rahman, M., Yang, X., Delbeke, T., Arijs, I., Kabue, J. P., Muyembe, J. J. & Van Ranst, M. (2006).** G8 rotavirus strains isolated in the Democratic Republic of Congo belong to the DS-1-like genogroup. *J Clin Microbiol* **44**, 1801–1809.
- Matthijnssens, J., Ciarlet, M., Heiman, E., Arijs, I., Delbeke, T., McDonald, S. M., Palombo, E. A., Iturriza-Gómara, M., Maes, P. & other authors (2008a).** Full genome-based classification of rotaviruses reveals a common origin between human Wa-like and porcine rotavirus strains and human DS-1-like and bovine rotavirus strains. *J Virol* **82**, 3204–3219.
- Matthijnssens, J., Ciarlet, M., Rahman, M., Attoui, H., Bányai, K., Estes, M. K., Gentsch, J. R., Iturriza-Gómara, M., Kirkwood, C. D. & other authors (2008b).** Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. *Arch Virol* **153**, 1621–1629.
- Matthijnssens, J., Rahman, M. & Van Ranst, M. (2008c).** Two out of the 11 genes of an unusual human G6P[6] rotavirus isolate are of bovine origin. *J Gen Virol* **89**, 2630–2635.
- Matthijnssens, J., De Grazia, S., Piessens, J., Heylen, E., Zeller, M., Giammanco, G. M., Bányai, K., Buonavoglia, C., Ciarlet, M. & other authors (2011).** Multiple reassortment and interspecies transmission events contribute to the diversity of feline, canine and feline/canine-like human group A rotavirus strains. *Infect Genet Evol* **11**, 1396–1406.
- Midgley, S. E., Hjulsager, C. K., Larsen, L. E., Falkenhorst, G. & Böttiger, B. (2012).** Suspected zoonotic transmission of rotavirus group A in Danish adults. *Epidemiol Infect* **140**, 1013–1017.
- Montenegro, F. M., Correia, J. B., Rodrigues Falbo, A., Dove, W., Nakagomi, T., Nakagomi, O., Cuevas, L. E., Cunliffe, N. A. & Hart, C. A. (2007).** Anticipating rotavirus vaccines in Brazil: detection and molecular characterization of emerging rotavirus serotypes G8 and G9 among children with diarrhoea in Recife, Brazil. *J Med Virol* **79**, 335–340.
- Mukherjee, A., Mullick, S., Deb, A. K., Panda, S. & Chawla-Sarkar, M. (2013).** First report of human rotavirus G8P[4] gastroenteritis in India: evidence of ruminants-to-human zoonotic transmission. *J Med Virol* **85**, 537–545.
- Mullick, S., Mukherjee, A., Ghosh, S., Pazhani, G. P., Sur, D., Manna, B., Nataro, J. P., Levine, M. M., Ramamurthy, T. & Chawla-Sarkar, M. (2013).** Genomic analysis of human rotavirus strains G6P[14] and G11P[25] isolated from Kolkata in 2009 reveals interspecies transmission and complex reassortment events. *Infect Genet Evol* **14**, 15–21.
- Nakagomi, O., Nakagomi, T., Akatani, K. & Ikegami, N. (1989).** Identification of rotavirus genogroups by RNA-RNA hybridization. *Mol Cell Probes* **3**, 251–261.
- Nordgren, J., Bonkoungou, I. J. O., Nitiema, L. W., Sharma, S., Ouermi, D., Simpore, J., Barro, N. & Svensson, L. (2012a).** Rotavirus in diarrheal children in rural Burkina Faso: high prevalence of genotype G6P[6]. *Infect Genet Evol* **12**, 1892–1898.
- Nordgren, J., Nitiema, L. W., Sharma, S., Ouermi, D., Traore, A. S., Simpore, J. & Svensson, L. (2012b).** Emergence of unusual G6P[6] rotaviruses in children, Burkina Faso, 2009–2010. *Emerg Infect Dis* **18**, 589–597.
- Okada, N. & Matsumoto, Y. (2002).** Bovine rotavirus G and P types and sequence analysis of the VP7 gene of two G8 bovine rotaviruses from Japan. *Vet Microbiol* **84**, 297–305.

- Page, N., Esona, M., Seheri, M., Nyangao, J., Bos, P., Mwenda, J. & Steele, D. (2010). Characterization of genotype G8 strains from Malawi, Kenya, and South Africa. *J Med Virol* **82**, 2073–2081.
- Parashar, U., Steele, D., Neuzil, K., Quadros, C., Tharmaphornpilas, P., Serhan, F., Santosham, M., Patel, M. & Glass, R. (2013). Progress with rotavirus vaccines: summary of the Tenth International Rotavirus Symposium. *Expert Rev Vaccines* **12**, 113–117.
- Pietsch, C., Petersen, L., Patzer, L. & Liebert, U. G. (2009). Molecular characteristics of German G8P[4] rotavirus strain GER1H-09 suggest that a genotyping and subclassification update is required for G8. *J Clin Microbiol* **47**, 3569–3576.
- Qian, Y. & Green, K. Y. (1991). Human rotavirus strain 69M has a unique VP4 as determined by amino acid sequence analysis. *Virology* **182**, 407–412.
- Quan, P. L., Firth, C., Conte, J. M., Williams, S. H., Zambrana-Torrel, C. M., Anthony, S. J., Ellison, J. A., Gilbert, A. T., Kuzmin, I. V. & other authors (2013). Bats are a major natural reservoir for hepaciviruses and pegiviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 8194–8199.
- Rahman, M., De Leener, K., Goegebuer, T., Wollants, E., Van der Donck, I., Van Hoovels, L. & Van Ranst, M. (2003). Genetic characterization of a novel, naturally occurring recombinant human G6P[6] rotavirus. *J Clin Microbiol* **41**, 2088–2095.
- Santos, N. & Hoshino, Y. (2005). Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *Rev Med Virol* **15**, 29–56.
- Santos, N., Lima, R. C., Pereira, C. F. & Gouvea, V. (1998). Detection of rotavirus types G8 and G10 among Brazilian children with diarrhea. *J Clin Microbiol* **36**, 2727–2729.
- Smith, I. & Wang, L. F. (2013). Bats and their virome: an important source of emerging viruses capable of infecting humans. *Curr Opin Virol* **3**, 84–91.
- Steele, A. D., Neuzil, K. M., Cunliffe, N. A., Madhi, S. A., Bos, P., Ngwira, B., Witte, D., Todd, S., Louw, C. & other authors (2012). Human rotavirus vaccine Rotarix provides protection against diverse circulating rotavirus strains in African infants: a randomized controlled trial. *BMC Infect Dis* **12**, 213.
- Steyer, A., Poljsak-Prijatelj, M., Barlic-Maganja, D. & Marin, J. (2008). Human, porcine and bovine rotaviruses in Slovenia: evidence of interspecies transmission and genome reassortment. *J Gen Virol* **89**, 1690–1698.
- Steyer, A., Bajzelj, M., Iturriza-Gómara, M., Mladenova, Z., Korsun, N. & Poljsak-Prijatelj, M. (2010). Molecular analysis of human group A rotavirus G10P[14] genotype in Slovenia. *J Clin Virol* **49**, 121–125.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. (2007). MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* **24**, 1596–1599.
- Timenetsky, M. do C., Santos, N. & Gouvea, V. (1994). Survey of rotavirus G and P types associated with human gastroenteritis in São Paulo, Brazil, from 1986 to 1992. *J Clin Microbiol* **32**, 2622–2624.
- Timenetsky, M. do C., Gouvea, V., Santos, N., Carmona, R. C. & Hoshino, Y. (1997). A novel human rotavirus serotype with dual G5–G11 specificity. *J Gen Virol* **78**, 1373–1378.
- Volotão, E. M., Soares, C. C., Maranhão, A. G., Rocha, L. N., Hoshino, Y. & Santos, N. (2006). Rotavirus surveillance in the city of Rio de Janeiro–Brazil during 2000–2004: detection of unusual strains with G8P[4] or G10P[9] specificities. *J Med Virol* **78**, 263–272.
- Zeller, M., Patton, J. T., Heylen, E., De Coster, S., Ciarlet, M., Van Ranst, M. & Matthijnssens, J. (2012). Genetic analyses reveal differences in the VP7 and VP4 antigenic epitopes between human rotaviruses circulating in Belgium and rotaviruses in Rotarix and RotaTeq. *J Clin Microbiol* **50**, 966–976.