

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

GISELDA MATOS XAVIER

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS GENES CODIFICADORES DE VP4 E VP7  
DE ROTAVÍRUS DE SUÍNOS E HUMANOS

Campos dos Goytacazes

2008

**GISELDA MATOS XAVIER**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS GENES CODIFICADORES DE VP4 E  
VP7 DE ROTAVÍRUS DE SUÍNOS E HUMANOS**

Tese apresentada ao Centro de Ciências e  
Tecnologias Agropecuárias da Universidade  
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,  
como parte das exigências para obtenção do  
título de Doutora em Produção Animal

ORIENTADOR: Prof. Carlos Eurico Pires Ferreira Travassos

Campos dos Goytacazes

2008

**GISELDA MATOS XAVIER**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS GENES CODIFICADORES DE VP4 E  
VP7 DE ROTAVÍRUS DE SUÍNOS E HUMANOS**

Tese apresentada ao Centro de Ciências e  
Tecnologias Agropecuárias da Universidade  
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,  
como parte das exigências para obtenção do  
título de Doutora em Produção Animal

Aprovada em        de março de 2008

Banca examinadora

---

Dr. Victor Martin Quintana Flores (Doutor – Biociências e Biotecnologia) - UENF

---

Dra. Adriane Nunes de Souza (Doutora – Ciências/Biologia da Agricultura e Ambiente) –  
UENF

---

Prof. Cláudio de Moraes Andrade (Doutor – Microbiologia) - PESAGRO

---

Prof. Carlos Eurico Pires Ferreira Travassos (Doutor, Microbiologia) – UENF  
(Orientador)

*A meus amores: Lucila, Gisele e Marlon*

## AGRADECIMENTO

Agradeço a Deus pelas vitórias e, principalmente, pelos desafios superados durante a realização deste trabalho;

À minha mãe Lucila, pelo exemplo de persistência e paciência;

À minha irmã Gisele, pelo carinho e dedicação dispensados;

Ao meu esposo Marlon, pelo exemplo de competência e minuciosidade durante a redação e pela compreensão, paciência e amor durante a finalização deste trabalho;

Ao meu orientador Prof. Carlos Eurico Travassos, por ter acreditado e confiado em mim para realização deste trabalho;

Ao Prof. Gonçalo Apolinário de Souza Filho, pela preciosíssima orientação;

A Valéria Marques e Verônica, técnicas do NAG, pela amizade, companheirismo e cumplicidade;

A Iliani Bianchi e Joseane Oliveira, pela paciência e bom humor durante os momentos nos quais parecia impossível prosseguir;

A FENORTE, pelo auxílio financeiro;

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

“A persistência é o caminho  
do êxito.”

Charles Chaplin

## RESUMO

Os rotavírus são os principais vírus associados à gastroenterite em humanos e animais, e geram prejuízos econômicos e sociais tanto em países desenvolvidos como em países em desenvolvimento. A principal meta para controle da rotavirose é a imunização dirigida contra as cepas circulantes pelo mundo. Entretanto, para tal, se faz necessário a vigilância epidemiológica, a partir da classificação molecular destas cepas a fim de instituir um programa de imunização específico e eficaz. Dentre as técnicas utilizadas para classificação molecular dos rotavírus destacam-se a RT-PCR seguida por Nested-PCR e o seqüenciamento. Este estudo objetivou analisar as seqüências de nucleotídeos de dois segmentos genéticos de rotavírus recuperados de quatro amostras fecais de suínos e duas de humanos. O seqüenciamento foi dirigido para os genes que codificam as proteínas VP4 e VP7, que induzem a resposta imunitária de modo independente e foi aplicado a todas as amostras testadas. Somente três amostras foram efetivamente seqüenciadas e geraram fragmentos de tamanho esperado para o gene de VP7 (1062 pares de bases). O gene de VP4 não foi seqüenciado em nenhuma amostra testada. Os resultados indicam que os rotavírus circulantes pertencem ao genótipo G9 (amostra 79), G5 (amostra 204) e G1 (amostra Hum-1) e compartilham alta similaridade entre amostras de suínos e de humanos, comprovando a diversidade genética característica dos RVs.

## ABSTRACT

Rotaviruses are the most viruses associated to gastroenteritis in humans and animals, causing economic and social burden both in developed countries and in developing countries. To control rotavirus disease by vaccination, it is necessary epidemiological surveillance from the molecular classification of these strains and establishing a program of immunization specific and effective. Among the techniques used for molecular classification of rotavirus it is the RT-PCR followed by nested-PCR and sequencing. The present study aimed to characterize the VP4 and VP7 encoding genes of porcine and human samples. Just three samples were sequenced and generated fragments of size expected for the gene of VP7 (1062 pairs of bases). VP4 gene was not sequencing in any sample tested. The results indicate that circulating rotavirus belong to genotype G9 (sample 79), G5 (sample 204) and G1 (sample Hum-1) and share high similarity between samples of pigs and humans, proving the genetic diversity characteristic of the RVs.

**Key words:** rotavirus, VP7, G-type



## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	3
2.1. Histórico .....	3
2.2. Morfologia.....	3
2.3. Classificação dos RVs.....	6
2.3.1. Sorogrupos e subgrupos .....	6
2.3.2. Sorotipos e genotipos.....	6
2.4. Genoma dos RVs .....	7
2.4.1. Diversidade do genoma dos RVs .....	10
2.4.1.1. Mutações pontuais .....	10
2.4.1.2. Recombinação genética (“reassortment”) .....	11
2.4.1.3. Rearranjo genômico .....	12
2.4.1.4. Transmissão interespécies.....	13
2.5. Proteínas dos RVs .....	15
2.5.1. Proteínas estruturais .....	15
2.5.1.1. Proteínas do cerne .....	15
2.5.1.2. Proteínas da camada intermediária.....	16
2.5.1.3. Proteínas da camada externa .....	16
2.5.2. Proteínas não-estruturais .....	18
2.6. Prejuízos causados por rotavírus .....	19
2.7. Epidemiologia molecular dos RVs.....	21
2.7.1 Importância.....	21
2.7.2. Tipos G e P .....	21
2.7.3. Evolução e filogenia molecular .....	24
2.8. Patogênese viral.....	24
2.9. Replicação viral .....	26
2.10. Apresentação clínica .....	27
2.11. Diagnóstico.....	29
2.12. Tratamento, controle e prevenção.....	29
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	32
3.1. Obtenção e viabilidade das amostras .....	32
3.2. Extração de RNA de fita dupla .....	32

3.3. RT-PCR - Reação em cadeia da polimerase precedida de transcrição reversa	33
3.4. Visualização dos produtos da RT-PCR (amplicons)	34
3.5. Precipitação, quantificação e seqüenciamento do DNA	35
3.6. Análise das seqüências	36
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1. RT-PCR	38
4.2. Seqüenciamento	40
5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	48
6. REFERÊNCIAS	49
ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO	60
EPIDEMIOLOGIA DOS GENOTIPOS P (VP4) E G (VP7) DE ROTAVÍRUS SUÍNOS DURANTE 2000-2003	62
CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS GENES CODIFICADORES DE VP4 E VP7 DE ROTAVÍRUS DE SUÍNOS E HUMANOS	69

## 1. INTRODUÇÃO

A gastroenterite relacionada aos rotavírus (RVs) é uma das principais causas de morbi-mortalidade observada em humanos de todo o mundo. Além da diarreia, a doença é acompanhada de vômito e febre entre 30-50% dos casos. Apesar da rotavirose ocorrer tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento, a epidemiologia entre as duas situações é distinta. Nos países em desenvolvimento, as crianças adquirem a infecção no início da vida, as infecções são registradas ao longo de todo o ano e a diversidade de cepas é maior do que em países desenvolvidos (PAHO, 2003). Além disso, mais de 80% das mortes relacionadas com a rotavirose ocorrem em países em desenvolvimento (PARASHAR et al, 2006).

Estima-se que, anualmente, ocorram aproximadamente 111 milhões de episódios diarreicos causados por RVs no mundo, somente entre crianças menores de cinco anos, resultando em cerca de 450.000 óbitos (Fukai, 2004).

Entre as espécies animais também se observa índices elevados de diarreia, principalmente entre indivíduos neonatos. A morbidade observada acarreta perda de peso dos animais, custo elevado com tratamentos, além de um risco real para saúde pública, uma vez que a transmissão interespecie é considerada possível (MENEGETTI et al, 2001; KHAMRIN et al, 2006; MARTELLA et al, 2006; FUKAI et al, 2007). Entretanto, dentro de uma unidade de produção animal, a diarreia ainda é considerada um problema relativamente comum, tanto para os produtores rurais, como para os trabalhadores e profissionais de saúde envolvidos na produção. Por ainda ser considerada comum, a diarreia é, muitas vezes, negligenciada pelos produtores até que medidas efetivas possam ser adotadas.

Tanto em animais como entre a população humana, recomenda-se o emprego de uma vacina eficaz, capaz de diminuir a gravidade da diarreia em infecções subseqüentes e, conseqüentemente as taxas de morbidade e mortalidade.

Uma vez que a diversidade genômica dos RVs é reconhecidamente um importante fator na ocorrência das diarreias, torna-se imprescindível uma vigilância epidemiológica das cepas circulantes, antes e após a implementação de programas

de imunização, semelhante à empregada para o monitoramento do vírus influenza e conforme preconizado pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 2005).

Com o objetivo de contribuir para o programa nacional de vigilância epidemiológica molecular, o presente trabalho descreve a caracterização molecular de RVs obtidos a partir de amostras diarréicas de suínos e de crianças menores de cinco anos de idade.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Histórico

Em 1943, Light e Hodes, citados por Gilio et al (1991) relataram a presença de um agente filtrável relacionado com diarreia em crianças hospitalizadas em Baltimore e Washington, nos Estados Unidos da América. O agente identificado pelos pesquisadores foi inoculado via oral em bezerros e os animais desenvolveram quadro diarreico.

Adams e Kraft, em 1963 observaram a partir de estudo por microscopia eletrônica de secções de intestino delgado de camundongos com diarreia, partículas virais inicialmente classificadas como vírus da epizootia diarreica de camundongos jovens, EDIM (do inglês “Epizootic Diarrhoea of Infant Mice”) (FLEWETT e WOODE, 1978).

Em 1973; Ruth Bishop et al visualizaram partículas virais no epitélio duodenal obtido de biopsias em crianças com diarreia e submetidas à análise por microscopia eletrônica (KAPIKIAN et al, 2001).

O agente viral observado pelos pesquisadores - e descritos primeiramente por Bishop (1973) - foi classificado como um novo gênero dentro da família *Reoviridae*, o Rotavírus, e desde então tem sido reconhecido como a principal causa, isolada ou associada a outros agentes infecciosos, de diarreia em humanos e animais (NETO, 1987; KAMINJOLO e ADESIYUN, 1994; MURPHY et al, 1995; LINHARES, 2000; KAPIKIAN et al, 2001).

O termo RV deriva da palavra em Latim “rota” (=roda) e foi sugerido devido ao formato do capsídeo externo quando observado por microscopia eletrônica de transmissão (KAPIKIAN et al, 2001), onde os capsômeros se apresentam irradiados a partir da borda central, e o capsídeo externo delimita uma nítida borda (FLEWETT e WOODE, 1978).

### 2.2. Morfologia

A partícula viral completa (vírion) tem simetria icosaédrica e é desprovida de envelope, o que lhe confere resistência a agentes detergentes e alguns desinfetantes, além de permitir sua presença no ambiente por longos períodos (RAMOS et al, 2000).

Os RVs medem aproximadamente 100 nm de diâmetro e têm um triplo capsídeo protéico, composto pelo cerne, camada intermediária e externa (KAPIKIAN et al, 2001).

O cerne encerra o genoma viral, com 11 segmentos de RNA dupla fita. Cada um dos segmentos responde pela codificação de pelo menos uma proteína (Figura 1), sendo seis destas proteínas estruturais e cinco não-estruturais. O segmento 11 da cepa símia SA11 responde pela codificação de duas proteínas não estruturais (MATION et al, 1991). As proteínas estruturais são designadas como VP (“Viral Protein”) e as não-estruturais como NSP (“Not Structural Protein”); ambas seguidas por um número, que representa os pesos moleculares em ordem decrescente (DESSELBERGER e McCRAES, 1994).

O cerne é formado pela proteína VP2, sendo esta a proteína mais abundante desta região do vírus (DESSELBERGER e McCRAES, 1994). Esta proteína está relacionada com a organização do genoma, interagindo com o RNA de fita dupla e com as demais proteínas do cerne, VP1 e VP3. A VP1 tem função de RNA polimerase RNA-dependente e a VP3 de ganilil metiltransferase (ESTES, 2001).

A proteína VP6 constitui a camada intermediária, sendo a proteína mais abundante do vírion, uma vez que participa com 50% de sua composição (DESSELBERGER e McCRAES, 1994).

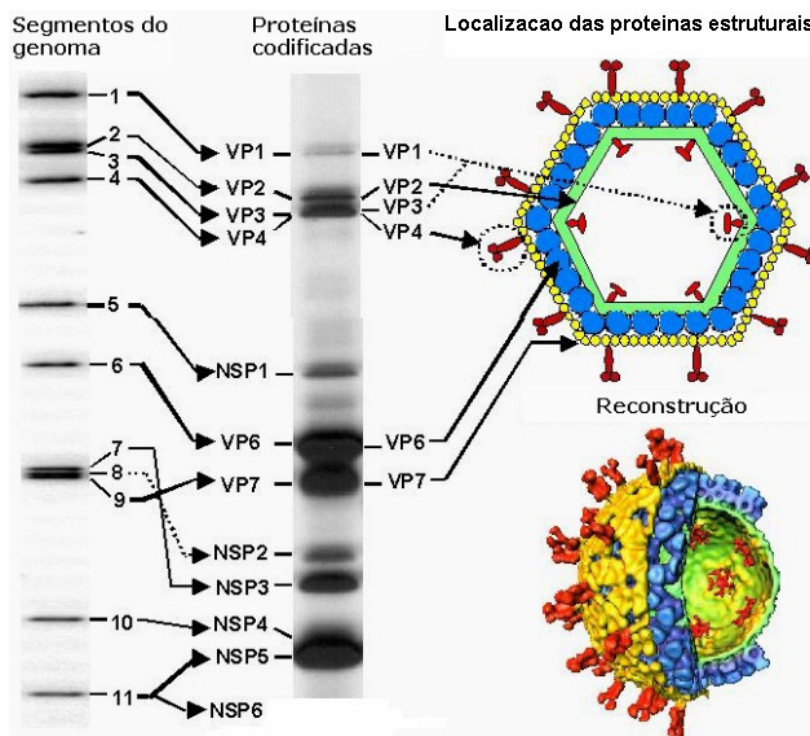
A camada externa do vírion é composta pela proteína VP7, que contribui com 30% do peso total do vírion e é considerada o principal antígeno indutor de anticorpos neutralizantes (DESSELBERGER e McCRAES, 1994).

Delgadas espículas medindo aproximadamente 120 Å de comprimento são freqüentemente observadas projetando-se a partir da superfície da camada externa, em materiais submetidos à microscopia eletrônica (ESTES, 2001). Estas espículas possuem uma porção distal bilobada (BOTH et al, 1994) e correspondem a dímeros da hemaglutinina VP4. Apesar de representar apenas 1,5% das proteínas totais do vírion, a VP4 é importante por também induzir a formação de anticorpos

neutralizantes (ROSEN et al, 1994), além de compor o capsídeo externo do vírus, junto com a VP7 (PRASAD e CHIU, 1994).

As proteínas não-estruturais são NSP1, NSP2, NSP3, NSP4 e NSP5. Todas estão envolvidas no processo de replicação viral e interagem com o ácido nucléico, exceto NSP4, que participa da morfogênese viral, além de atuar como enterotoxina (ESTES, 2001).

Uma característica da estrutura dos RV é a presença de 132 canais que, de acordo com sua localização, são classificados nos tipos I, II e III. Estes canais interligam a superfície externa com o cerne interno e possivelmente estão envolvidos na importação de metabólitos requeridos para a transcrição do RNA e na exportação dos RNA transcritos, para o subsequente processo de replicação viral (PESAVENTO et al, 2003).



**Figura 1:** Estrutura dos RVs. No painel à esquerda estão representados os 11 segmentos genômicos do vírus, conforme seu padrão de migração em gel de poliacrilamida. No centro, estão representadas as proteínas codificadas por cada segmento de RNA de fita dupla e na direita a localização esquemática das proteínas estruturais e da tripla camada do vírion.

**FONTE:** ESTES (2001) (adaptado).

NOTA: Os segmentos numerados mostrados no painel à esquerda são baseados na migração do genoma de RVs grupo A da cepa SA11.

## **2.3. Classificação dos RVs**

### **2.3.1. Sorogrupos e subgrupos**

A proteína VP6 contém antígenos que permitem a classificação dos RV em 7 sorogrupos: A, B, C, D, E, F e G, os quais podem ser identificados por testes sorológicos como ELISA e Imunofluorescência (ESTES, 2001).

Os RVs do grupo A já estão bem estabelecidos como agentes causadores de diarreia em animais e crianças. Os vírus pertencentes ao grupo B têm sido associados a epidemias de diarreia aguda em adultos na China (ESTES, 2001). De acordo com trabalhos de Saif e Jiang, 1994; Morin et al, 1990; Saif, 1980; Saif et al, 1980 citados por KIM et al (1999), os RVs do grupo C têm sido relatados como causa de diarreia em leitões nas fases de amamentação e creche, enquanto que os grupos D, E, F e G têm sido associados a eventos esporádicos de diarreia em animais (ESTES, 2001).

### **2.3.2. Sorotipos e genotipos**

Dentro de cada grupo, os RVs são classificados em sorotipos de acordo com sua reatividade em ensaios de neutralização.

A VP4 permite classificar os RVs em diferentes sorotipos (Tabela 1), que são denominados P devido à sensibilidade que esta proteína apresenta frente a enzimas proteolíticas. Uma classificação, baseada em ensaios de neutralização, permite a identificação de 14 sorotipos P, incluindo três subtipos (KAPIKIAN et al, 2001).

A utilização de anticorpos monoclonais dirigidos contra a VP7 e testes de neutralização permitem a classificação dos RVs em pelo menos 15 sorotipos (VARSHNEY et al, 2002), denominados G por ser a VP7 uma glicoproteína (KAPIKIAN et al, 2001).

Os RVs podem ser classificados ainda com base nos segmentos genômicos que codificam as proteínas indutoras de resposta imune, VP4 e VP7 (Figura 1).



VP7 sorotipo [VP4 Genotipo]	Espécie
1[1]	Humana, Suína, Bovina
2[2]	Humana, Suína
3[3]	Humana, Símia, Canina, Felina, Eqüina, Suína, Leporina, Ovina, Murina
4[4]	Humana, Suína
5[5]	Humana, Suína, Equina
6[6]	Humana, Bovina, Ovina
7[7]	Aviária, Bovina
8[8]	Humana, Bovina
9[9]	Humana, Suína, Ovina
10[10]	Humana, Suína, Bovina, Ovina
11[11]	Suína
12[12]	Humana
13[13]	Equina
14[14]	Equina
[15]	Bovina
1A[8]	Humana, Suína, Ovina
1B[4]	Humana
2A[6]	Humana
2B[6]	Suína
3[9]	Humana, Felina
4[10]	Humana
4[12]	Equina
5A[3]	Humana, Canina, Felina
5B[3]	Símia
5B[2]	Símia
6[1]	Bovina, Símia, Ovina
7[5]	Humana, Suína, Bovina
8[11]	Humana, Bovina, Ovina
9[7]	Suína, Equina
10[16]	Murina
11[14]	Leporina
12[19]	Humana, Suína
13[20]	Murina
[13]	Suína
[15]	Ovina
[17]	Bovina, Ave
[18]	Equina
[20]	Murina
[21]	Bovina
[22]	Leporina
14[23]	Suína
11[24]	Humana
[25]	Humana
[26]	Suína
[27]	Suína
[28]	Suína

**Tabela 1:** Classificação sorotípica e genotípica de RVs do grupo A baseada na especificidade de VP4 e VP7.

**Fonte:** Kapikian et al (2001) (modificado).

Através de técnicas de seqüenciamento, hibridização e amplificação de ácidos nucléicos já foram descritos 28 tipos (ou genótipos) P diferentes de acordo com a especificidade de VP4 e 15 tipos G (ou genótipos) distintos em relação a VP7 (KAPIKIAN et al, 2001).

## 2.4. Genoma dos RVs

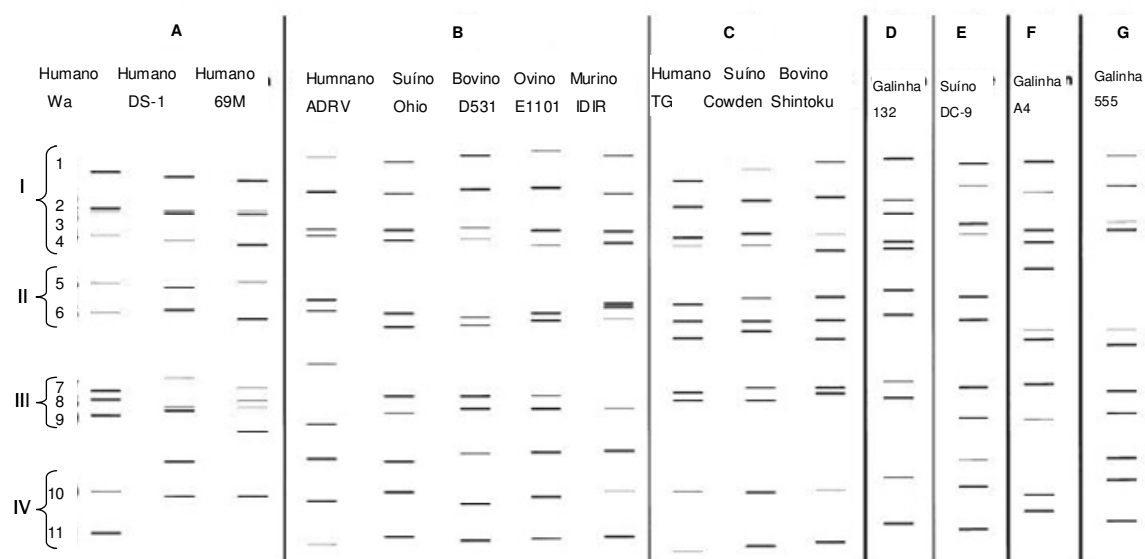
Os segmentos de RNAs de fita dupla que compõem o genoma viral variam, em peso molecular, de 200 a 2000 KDa, com um tamanho de 667 a 3302 pares de base (pb), de acordo com a cepa (KAPIKIAN et al, 2001).

Os 11 segmentos podem ser divididos em quatro classes com pesos moleculares diferentes (Figura 2). Esta distribuição pode ser evidenciada através de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE, do inglês "Polyacrilamide Gel Electrophoresis"), onde os segmentos de maior peso molecular migram mais lentamente que os de menor peso (RAMIG, 1994).

De acordo com a migração dos segmentos genômicos durante a PAGE, os segmentos de RNA de 1 a 4 são agrupados como classe I, os segmentos 5 e 6 como classe II, os segmentos 7 a 9 como classe III e os segmentos 10 e 11 como classe IV (ESTES, 2001), formando, ao final da análise, uma migração característica denominada eletroferotipo (SILVA et al, 2001a), que, no caso dos RVs do grupo A, assume o padrão IV-II-III-II (4-2-3-2).

Três diferentes perfis (longo, curto e supercurto) estão associados com diferenças na mobilidade do segmento 11 para cepas com padrão longo, e do segmento 10 para cepas com padrão curto e supercurto (TANIGUCHI e URUSAWA, 1995).

Aparentemente o perfil longo predomina sobre os demais em infecções de origem humana envolvendo os tipos G1, G3 e G4, enquanto que o perfil curto é o dominante em infecções com o tipo G2 (LINHARES, 2000) e supercurto em infecções envolvendo o tipo G8 (TANIGUSHI e URUSAWA, 1995).



**Figura 2:** Padrão de migração eletroforética dos RVs. São mostrados representantes dos sete grupos (A-G) e as classes formadas (I, II, III e IV) de acordo com a migração dos segmentos genômicos.

**Fonte:** Kapikian et al., 2001 (modificado).

O perfil longo é mais encontrado também em amostras de origem animal. Entretanto, a correlação entre a origem da amostra e o padrão de migração dos segmentos 10 e 11 não deve ser o único método de escolha para classificação dos RVs, uma vez que a constituição genética destes vírus é muito grande e variável (TANIGUSHI e URUSAWA, 1995).

Cada segmento de RNA começa com uma seqüência de guanidina, localizada no terminal 5' seguida por um conjunto de seqüências conservadas, que fazem parte da região não codificadora do gene. Em seguida inicia-se a região codificadora do gene com uma longa fase aberta de leitura (ORF) que, por sua vez, termina com um códon de parada. Após o códon de parada é encontrado outro conjunto de seqüências não codificadoras que contêm um subconjunto no terminal 3', que termina com uma citidina (ESTES, 2001).

Assim, existem seqüências conservadas nos terminais 5' e 3' de cada segmento genômico, que variam entre os diferentes segmentos de RNA de uma cepa (DESSELBERGER e McCRAES, 1994). Esta conservação entre as seqüências terminais sugere que elas possuam importantes sinais para transcrição, transporte do mRNA, replicação ou montagem dos segmentos do genoma viral (ESTES, 2001).

### 2.4.1. Diversidade do genoma dos RVs

A presença de diferentes cepas de RVs envolvidas em uma infecção ou em uma epidemia, associada à facilidade que estes vírus possuem em compartilhar seus segmentos genômicos, gerando uma progênie distinta das cepas de origem, caracterizam a diversidade genética destes vírus (GOUVEA e BRANTY, 1995). Ressalta-se que, teoricamente, os 11 segmentos genômicos dos RVs podem se reagrupar em  $2^{11}$  possibilidades diferentes, considerando o rearranjo como um fenômeno randômico (GOMBOLD e RAMIG, 1994).

Considerando os 15 G e 28 P tipos descritos (Tabela 1) são possíveis 420 combinações G-P diferentes, o que esboça a enorme diversidade dos RVs.

Os RVs dispõem de vários mecanismos que aumentam sua diversidade e dirigem sua evolução: mutações pontuais, permuta de segmentos de RNA entre diferentes cepas (recombinação genética ou “reassortment”), rearranjo genômico e transmissão interespécies (PORTELLA, 1999; PALOMBO, 2002).

#### 2.4.1.1. Mutações pontuais

Estima-se que entre os RVs ocorra uma taxa de mutação de  $10^{-5}$  mutações por nucleotídeo por replicação e o acúmulo destas mutações pontuais pode gerar um novo fenótipo viral durante uma epidemia (PALOMBO, 2002).

Uma vez que as proteínas de superfície VP4 e VP7 são afetadas pelos anticorpos neutralizantes do hospedeiro, os segmentos genéticos codificadores destas proteínas são replicados mais rapidamente que aqueles que codificam as proteínas internas (estruturais ou não) e, portanto, estão sujeitos a mutações mais frequentes (TANIGUSHI e URASAWA, 1995).

Dentre os principais G tipos que causam infecções em humanos (G1-G4), as seqüências de aminoácidos deduzidas para VP7 variam em mais de 22%, enquanto que as demais proteínas estruturais e não-estruturais exibem uma diversidade de 15% (PALOMBO, 2002).

De acordo com a localização das mutações pontuais algumas características virais podem ser alteradas. Análises da seqüência do gene que codifica VP7 da

cepa humana IAL-28 sugerem que a substituição de um ou dois aminoácidos na posição 96 e 100 pode ter conferido dupla especificidade (G5 e G11) a esta cepa (TIMENETSKY et al, 1997).

#### **2.4.1.2. Recombinação genética (“reassortment”)**

Quando as células são infectadas com duas ou mais cepas de RVs diferentes e compatíveis, cerca de 30% da progênie resultante após 40 horas de infecção contém novos agrupamentos de segmentos genéticos. As cepas resultantes dessas infecções mistas podem responder por um surto ou epidemia, caracterizando o processo evolutivo do vírus (TANIGUCHI e URUSAWA, 1995).

A recombinação genética é o principal mecanismo evolutivo entre cepas circulantes de RVs e explica a presença de segmentos genéticos de cepas de origem humana em animais e vice-versa. Por exemplo, na cepa humana 116E, o gene que codifica VP4 está relacionado ao mesmo gene na espécie bovina - P8[11]G10 - enquanto que os segmentos restantes relacionam-se a cepas humanas típicas (GENTSCH et al, 1993).

Kool et al (1992) isolaram uma cepa resultante da co-infecção de células MA-104, provenientes de rim fetal de macaco verde africano, com RVs de origem aviária (Ty) e outro de origem símia (RRV), sugerindo que a recombinação genética entre estas espécies *in vivo* não deve ser descartada.

A cepa humana CMH222, classificada como P[3]G3 durante um levantamento epidemiológico na Tailândia, apresentou elevada homologia com gene que codifica VP4 de RVs caprinos e com gene que codifica VP7 de RV símios, o que demonstra a ocorrência de recombinação genética *in natura* (KHAMRIN et al, 2006).

Outros RVs resultantes de recombinação genética *in natura* e *in vitro* têm sido identificados e caracterizados por diversos pesquisadores (CUNLLIFE et al, 2000; TEODOROFF et al, 2005; MANEEKARN et al, 2006; PARK et al, 2006; MARTELLA et al, 2006; BANERJEE et al, 2007; GULATI et al, 2007; MUNFORD et al, 2007).

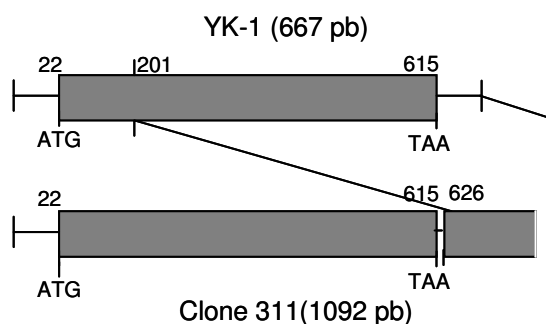
### 2.4.1.3. Rearranjo genômico

O rearranjo genômico consiste em alterações de áreas consideráveis dentro do segmento do gene em decorrência de deleções - observadas na PAGE como bandas que migram mais rapidamente - ou de duplicações, observadas como bandas que migram lentamente devido ao aumento do tamanho do segmento genético (Figura 3) (TANIGUCHI e URUSAWA, 1995; ESTES, 2001).

No caso de rearranjos por duplicação, observa-se que a fase aberta de leitura (ORF, do inglês "open reading frame") e as regiões não codificadoras localizadas na porção 5' e 3' do segmento genético são conservadas, embora algumas proteínas de peso molecular anormal sejam produzidas em algumas cepas. Estima-se que até 2.000 pb podem ser adicionadas sem afetar a viabilidade do vírion (TANIGUCHI e URUSAWA, 1995).

A ocorrência dos perfis curto e supercurto pode ser explicada quanto à presença de rearranjos genéticos. Em algumas cepas de RVs, principalmente classificadas como G2, um rearranjo genético no segmento 11 resulta migração eletroforética mais lenta deste segmento em relação ao segmento 10, resultando no padrão curto de RNA. Em outras cepas, o segmento 11 se torna muito maior e migra mais rapidamente do que no padrão curto, gerando o padrão conhecido como supercurto (AHMED et al, 2007). A análise da seqüência do gene que codifica NSP5 da cepa belga, B4106, por exemplo, revelou que a mobilidade alterada do eletroferotipo deste segmento foi resultado de um rearranjo genético envolvendo duas inserções pequenas e uma deleção, gerando este tipo de padrão (MATTHIJNSSENS et al, 2006).

Teoricamente todos os segmentos genômicos podem sofrer rearranjos, entretanto, nos segmentos cinco e onze a freqüência desses eventos é maior (ESTES, 2001).



**Figura 3:** Rearranjo genético de gene 11 de RVs de origem símia. Diagrama esquemático da seqüência do gene 11 da cepa símia YK-1 e do clone 311. O rearranjo consistiu na duplicação parcial do segmento 11 da cepa YK-1 a partir do nucleotídeo localizado na posição 201.

**Fonte:** Westerman et al, 2006.

#### 2.4.1.4. Transmissão interespécies

A hipótese de que cepas de RVs de origem humana podem infectar e produzir a rotavirose em animais e vice-versa surgiu a partir da identificação de uma cepa classificada como sorotipo G3, subgrupo I e com padrão longo quando submetida a PAGE; classificação até então observada somente em RV de origem animal (NAKAGOMI e NAKAGOMI, 1993).

Desde então, diversos estudos têm comprovado que esta transmissão não só ocorre, como também é um mecanismo de evolução que, em consonância com os demais, favorece o aparecimento de novas e atípicas cepas (PALOMBO, 2002; GENTSCH et al, 2005; MATTHIJNSSENS et al, 2006; KHAMRIN et al, 2006). A Tabela 2 indica alguns exemplos de cepas de RVs possivelmente originadas pelo mecanismo de transmissão interespécies.

Os eventos envolvendo recombinação genética são mais freqüentes em países em desenvolvimento. As condições socioeconômicas e climáticas existentes nesses países, associadas à baixa imunidade de crianças e animais, ao contato próximo entre eles e a precariedade de algumas criações de animais, parece favorecer o aparecimento de infecções mistas e, como conseqüência, a recombinação genética (TANIGUCHI e URUSAWA, 1995; GOUVEA e BRANTY, 1995; KHAMRIN et al, 2006; GHOSH et al, 2007).

Cepa	Espécie isolada	Provável origem
AU-1	Humano	Felino
Ro1845	Humano	Felino/Canino
HCR3	Humano	Felino/Canino
PA151	Humano	Bovino (Felino)
PA169	Humano	Bovino
HAL1166	Humano	Bovino
I321	Humano	Bovino
Rotavírus G5	Humano	Suíno
ICB2185	Suíno	Humano
Mc323/Mc345	Humano	Suíno
P343	Suíno	Bovino
H-1	Humano	Suíno
B4106	Leporino	Humano
116E	Humano	Bovino
CMH222	Humano	Caprino/Símio
Sun9	Humano	Bovino

**Tabela 2:** Cepas de RV derivadas da transmissão interespécies.

**Fonte:** Palombo, 2002 (adaptado).

Os RVs são transmitidos entre diferentes espécies animais como infecções mistas. Esta observação é possível a partir da identificação de diferentes cepas envolvidas em uma infecção dentro de uma comunidade específica. Entretanto, estas diferentes cepas são submetidas à seleção natural imposta pelo ambiente e pelo sistema imune do hospedeiro, resultando em novas e diversas populações de vírus (GOUVEA e BRANTY, 1995).

A transmissão interespécies pode ocorrer com a transferência de todos os 11 segmentos genéticos da cepa “doadora”, ou por recombinação genética entre cepas que estejam co-circulando no mesmo ambiente e que sejam provenientes de espécies diferentes, favorecendo o aparecimento de outra cepa capaz de infectar a espécie “receptora” (RAHMAN et al, 2005; KHAMRIN et al, 2006).



## 2.5. Proteínas dos RVs

As proteínas que compõem os RVs podem ser divididas em proteínas estruturais e não-estruturais.

### 2.5.1. Proteínas estruturais

A Tabela 3 sumariza as funções conhecidas das proteínas constituintes dos RVs.

Proteína	Função
VP1	RNA Polimerase RNA-dependente; liga-se a RNA fita simples
VP2	Ligação de RNA; é requerida para a atividade de replicase de VP1
VP3	Guaniltransferase e metiltransferase
VP4	Antígeno de neutralização tipo P específico; determinante de virulência, proteína de ligação à célula; é clivada em Vp5* (permeabiliza a membrana) e VP8*
NSP1	Associa-se com o citoesqueleto; atua na supressão da resposta por IFN- $\alpha$ do hospedeiro
VP6	Antígeno de grupo e subgrupo; é requerida para transcrição
NSP3	Envolvida na regulação da transcrição; liga o terminal 3' do mRNA
NSP2	Envolvida na formação de viroplasmas; atividade NTPase e helicase; liga NSP5 e VP1; essencial para a síntese de RNA de fita dupla
VP7	Antígeno de neutralização tipo G; proteína ligante de cálcio
NSP4	Enterotoxina; receptor para o brotamento das partículas duplo capsídeo através da membrana do Retículo Endoplasmático
NSP5	Constituinte dos viroplasmas; liga ssRNA; interage com NSP2 e NSP6
NSP6	Constituinte dos viroplasmas; interage com NSP5

**Tabela 3:** Funções das proteínas estruturais (VP) e não-estruturais (NSP) dos RVs.  
**Fonte:** Angel et al, 2007.

#### 2.5.1.1. Proteínas do cerne

A VP1 é codificada pelo segmento 1 (3302 pb) do genoma viral e responde por apenas 2% do total de proteínas do vírion, sendo a proteína com maior peso molecular (125 kDa) e número de aminoácidos (1088). Está localizada no cerne do vírion e possui atividade de RNA polimerase RNA-dependente, além de funcionar como componente estrutural do vírus (ESTES, 2001).

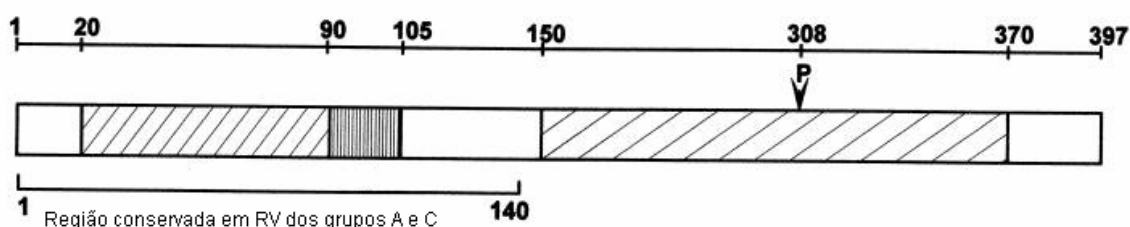
A VP2, codificada pelo segmento 2 (2690 pb) do genoma viral, contribui com 12-15% do total de proteínas do vírion e é composta por 881 aminoácidos. Esta proteína possui grande habilidade de se ligar de modo inespecífico ao RNA de fita dupla e, junto com a VP1, é requerida para a atividade de replicase (ESTES, 2001; DESSELBERGER e McCRAES, 1994).

Das proteínas do cerne, a VP3 é o menor componente do vírion (0,5%) e do cerne (3%). Postula-se que a VP3 forma um complexo com VP2, ligando-se a sua porção N-terminal, requerida para a replicação do RNA, além de desempenhar a função de guanilil e metiltransferase. Esta proteína, composta por 776 aminoácidos, é codificada pelo segmento 3 do genoma, que possui 2591 pb (ESTES, 2001).

### 2.5.1.2. Proteínas da camada intermediária

O segmento 6 (1356 pb) do genoma viral responde pela codificação da proteína viral mais abundante, a VP6 (Figura 4), que constitui 50% do peso total do vírion (DESSELBERGER e McCRAES, 1994) e é composta por 397 aminoácidos (ESTES, 2001).

Sua interação tanto com a VP4 como com a VP7 permite deduzir que a VP6 desempenha um importante papel na estrutura do vírion (ESTES, 2001), além de ser o principal antígeno na detecção dos RV através de ensaios sorológicos (HOSHINO e KAPIKIAN, 1994).



**Figura 4:** Características da proteína VP6. A prolina (P) parece estabilizar a estrutura trimérica da proteína, que é muito estável e que por isso, parece ser o principal antígeno alvo nos testes diagnóstico.

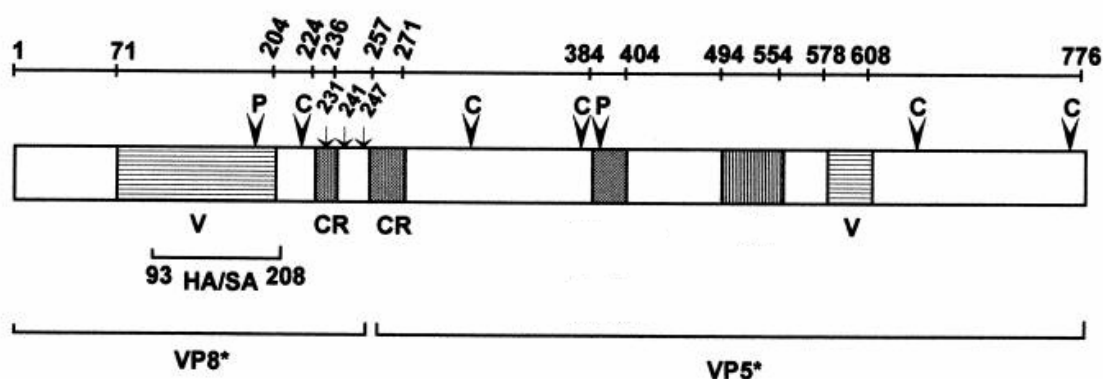
**FONTE:** Estes, 2001 (adaptado).

### 2.5.1.3. Proteínas da camada externa

A VP4 (Figura 6), produto do quarto segmento (2362 pb) do genoma é uma proteína não-glicosilada do capsídeo externo, compõe apenas 1,5% das proteínas do vírion e é constituída por 776 aminoácidos entre as cepas de origem animal e 775 entre as de origem humana. Além de funcionar como hemaglutinina é a proteína de fixação do vírus na célula. Quando é clivada em VP5\* (60 kDa) e VP8\* (28 kDa),

através da ação de enzimas proteolíticas como tripsina, por exemplo, a infecciosidade viral aumenta e a qualidade de penetração do vírus na célula melhora.

Apesar de ser um dos componentes em menor proporção no vírion, a VP4 desempenha importante papel na indução de anticorpos neutralizantes (DESSELBERGER e McCRAES, 1994).



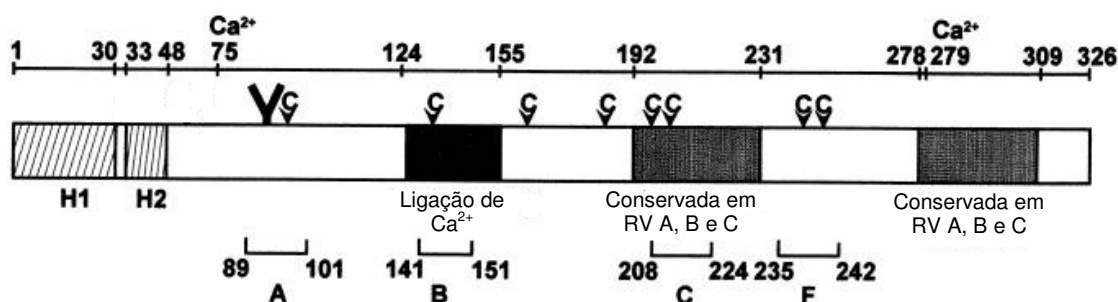
**Figura 5:** Características da proteína VP4. Estão indicados os dois produtos da clivagem por tripsina (VP8\* e VP5\*), os locais de clivagem (↓), as regiões variáveis (V) e conservadas (CR), bem como as cisteínas (C) e prolinas (P) conservadas. Os domínios referentes à atividade de hemaglutinação (HA) e os locais de ligação do ácido siálico (SA) também estão indicados.

**FONTE:** ESTES, 2001 (adaptado).

A VP7 (Figura 6) é a principal proteína do capsídeo externo do vírus e o principal antígeno para anticorpos neutralizantes. Ela pode ser codificada pelo 7º, 8º ou 9º (1104, 1059 e 1062 pb, respectivamente) segmento do gene, dependendo da cepa viral e é composta por 315, 317 ou 326 aminoácidos, também de acordo com a cepa. A VP7 compõe 30% do peso do vírion e é considerada a segunda proteína mais abundante na partícula viral (DESSELBERGER e McCRAES, 1994; ESTES, 2001).

Os vários resíduos conservados de cisteína presentes na VP7 parecem ser responsáveis pela formação de epítomos neutralizantes, na medida em que permitem a formação de diversas pontes dissulfetos (DESSELBERGER e McCRAES, 1994).

Além de induzir a formação de anticorpos neutralizantes, parece que a VP7 também está envolvida no processo de adsorção do vírus à célula (DESSELBERGER e McCRAES, 1994).



**Figura 6:** Características da proteína VP7. São mostrados os domínios hidrofóbicos H1 e H2 da proteína, os domínios conservados entre RVs dos grupos A, B e C, bem como o local de ligação do cálcio e de glicosilação (V), cisteínas conservadas e os epítomos de neutralização A, B, C e F.

**FONTE:** Estes, 2001 (adaptado).

### 2.5.2. Proteínas não-estruturais

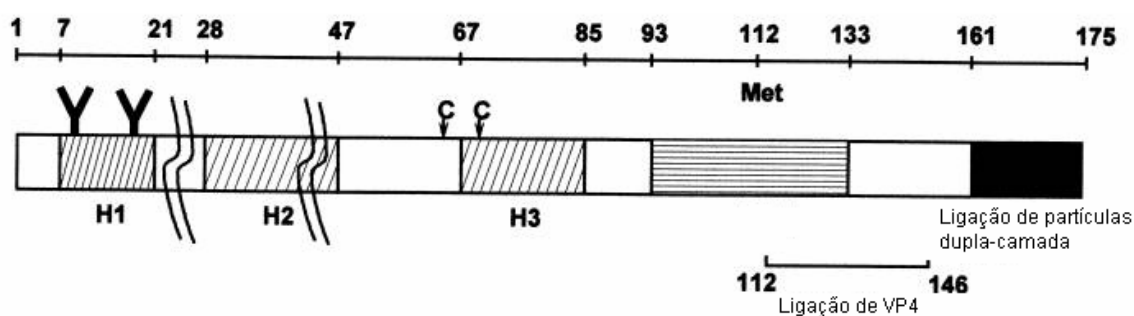
A NSP1 é a proteína codificada pelo quinto segmento (1581 pb) de RNA de fita dupla, possui peso molecular de 53 kDa e é produzida em pequenas concentrações no início da infecção viral, quando está ligada ao RNA de fita dupla. A proteína é composta por 491 aminoácidos e possui um domínio relativamente conservado de zinco, que pode não estar presente em algumas cepas, parece não ser essencial na replicação viral (DESSELBERGER e McCRAES, 1994; ESTES, 2001).

A proteína NSP2 é produzida pelo oitavo segmento de RNA da cepa símia SA11 e humana Wa, sétimo segmento da cepa bovina UK ou nono da cepa símia RRV, possui peso molecular de 35 kDa e 317 aminoácidos. A NSP2 parece estar envolvida na formação do complexo capsídeo-RNA (DESSELBERGER e McCRAES, 1994; ESTES, 2001) e na constituição, juntamente com a NSP5, dos viroplasmas durante a replicação do RV (ROMERO e NORIEGA, 2006).

O segmento de número 7 na cepa SA11, número 8 em RRV e 9 na cepa bovina UK é responsável pela codificação da proteína NSP3, com 35 kDa de peso e 315 aminoácidos. Esta proteína se liga ao mRNA viral, melhorando a qualidade de translação do mRNA (DESSELBERGER e McCRAES, 1994; ESTES, 2001).

O segmento 10 do genoma viral, com 751 pb, contém a seqüência para a proteína NSP4 (Figura 7), com 28 kDa e 175 aminoácidos. É a única proteína não-estrutural que não está ligada ao RNA. Seu domínio C-terminal funciona como um

receptor intracelular sobre a membrana do retículo endoplasmático, de modo que quando é bloqueada (pela ação de, por exemplo, tunicamicina) todas as partículas virais observadas no retículo endoplasmático, permanecem envelopadas. Além disso, parece que a NSP4 funciona como fator de virulência e age reduzindo a absorção de glicose nas células epiteliais, bem como induzindo a secreção de cloreto (DESSELBERGER e McCRAES, 1994; ESTES, 2001).



**Figura 7:** Características da proteína NSP4. H1, H2 e H3 indicam os domínios hidrofóbicos e (Y) os locais de glicosilação. Resíduos no domínio H1 estão localizados no lúmen do Retículo Endoplasmático, enquanto parte dos aminoácidos do domínio H2 são citoplasmáticos.

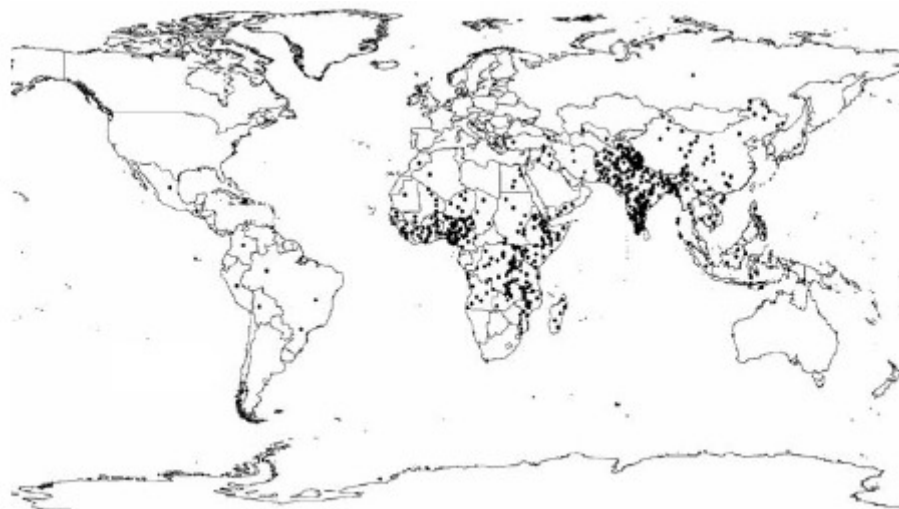
**FONTE:** Estes, 2001 (adaptado).

A NSP5 é codificada pelo menor dos segmentos genômicos, o segmento 11, com 667 pb. A proteína tem 198 aminoácidos e um peso molecular aproximado de 26 kDa, interagindo com a VP2 e ligando-se ao RNA de modo inespecífico (DESSELBERGER e McCRAES, 1994; ESTES, 2001).

A NSP6 é codificada em uma ORF alternativa no segmento do gene 11 da maioria dos RVs e é conhecida por interagir com a NSP5 e se acumular no viroplasma. Parece que, juntamente com a NSP2 e a NSP5, a NSP6 responde pelo recrutamento ou movimento das outras proteínas virais dentro do viroplasma, pela encapsidação do RNA ou pelo movimento das partículas virais nascentes até a membrana do retículo endoplasmático (DESSELBERGER e McCRAES, 1994; ESTES, 2001;).

## 2.6. Prejuízos causados por rotavírus

Entre 2000 e 2004, 39% das internações hospitalares de crianças com diarreia ocorreram devido aos RVs, em todo o mundo, e mais de 80% das mortes foram registradas nos países mais pobres, como os do sul da Ásia e da África (Figura 8), segundo estimativas de Parashar et al (2006).



**Figura 8:** Distribuição global de mortes relacionadas aos RVs. Cada ponto sobre o mapa representa 1000 mortes.

**Fonte:** Parashar et al, 2006.

Em oito países que representam 68% do total anual de nascimentos na América Latina, os RVs respondem por aproximadamente 190 mil hospitalizações e 5.000 mortes, gerando um ônus de cerca de US\$ 85 milhões, somente no ano de 2003 (RHEINGANS et al, 2007), conforme mostrado na Tabela 3.

Países	Número de hospitalizações	Número de mortes	Estimativa de gastos (em US\$)
Argentina	22.856	99	8.137.641
Brasil	120.513	2.475	33.537.642
Chile	8.008	13	5.402.388
Rep. Dominicana	4.882	443	1.032.454
Honduras	2.896	663	1.753.684
México	16.086	923	27.867.608
Panamá	1.684	37	1.152.441
Venezuela	13.502	384	6.183.961
Total	190.528	5.038	85.067.819

**Tabela 3:** Prejuízo econômico e de saúde pública causado por RVs. Estimativa referente ao ano de 2003 e inclui custos diretos (como medicamentos, transporte e exames laboratoriais) e indiretos (como visitas ao paciente internado e dias perdidos de trabalho).

**Fonte:** Rheingans et al, 2007 (modificado).

Existem poucos estudos relacionados aos prejuízos causados pelos RVs em uma unidade de produção animal. De acordo com House (1978), o prejuízo alcançado por surtos epidêmicos de RVs pode ultrapassar a cifra de 3 milhões de dólares por ano somente para a espécie bovina dos Estados Unidos da América.

## **2.7. Epidemiologia molecular dos RVs**

### **2.7.1 Importância**

A partir da reunião regional sobre a implantação da vigilância epidemiológica de rotavírus, que ocorreu no Peru em 2003, a Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) elaborou uma série de recomendações, entre elas algumas de caráter geral envolvendo os estudos epidemiológicos dos RVs e um banco de dados sobre sua vigilância. Neste documento, destaca-se que “[...] é prioridade a caracterização dos sorotipos G e P mais comuns, a fim de se considerar sua inclusão na produção de vacinas” e que “após implantação das vacinas, é essencial o monitoramento das cepas circulantes”. Além disso, “pode-se utilizar para a genotipagem dos vírus, a Reação em Cadeia da Polimerase, precedida de Transcrição-Reversa (RT-PCR, do inglês “Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction”). O documento também ressalta o uso de técnicas de seqüenciamento para cepas não detectadas por anticorpos monoclonais ou pela RT-PCR (PAHO, 2003).

### **2.7.2. Tipos G e P**

A correlação que existe entre sorotipos e genotipos, observada para VP7, não se aplica a VP4. Devido à dificuldade de classificação dos sorotipos referentes à proteína VP4, os estudos relacionados ao quarto gene do genoma dos RVs, têm sido baseados em técnicas como seqüenciamento, hibridização e amplificação de ácidos nucléicos pela reação em cadeia de polimerase (PCR, do inglês “Polymerase Chain Reaction”) (KAPIKIAN et al, 2001).

Para integrar a denominação dos RVs, para a proteína VP4, a letra P seguida por um número arábico refere-se a sorotipo e a letra maiúscula refere-se a subtipo, enquanto que o genotipo é designado por um número arábico entre colchetes. Para a VP7a letra G seguida por um número refere-se tanto ao sorotipo como ao genotipo relacionado. (KAPIKIAN et al, 2001). Assim, por exemplo, as cepas de RV de origem suína OSU (Ohio State University) e humana Wa são classificadas como P9[7]G5 e P1A[8]G1, respectivamente (ESTES, 2001).

Dos 15 tipos G (tanto sorotipos como genotipos) até agora identificados, 10 foram encontrados em humanos (G1 a G6, G8 a G10, G12). Para os 28 genotipos P (e 15 sorotipos) identificados, 12 tipos já foram descritos em humanos (P[1] a P[6], P[8] a P[10], P [12], P[19] e P[24]). Devido às infecções mistas, rearranjos moleculares dos vírus e possível transmissão interespecies, não são raros a detecção de tipos G e P que são considerados de origem humana em animais e a detecção de tipos animais em humanos (ESTES, 2001; KAPIKIAN et al, 2001).

SANTOS e HOSHINO (2005) realizaram uma análise de dados a partir de 108 estudos que foram publicados entre 1989 e 2003, envolvendo 50 países e totalizando 42.757 cepas de RVs. A distribuição dos tipos G encontrados foi: G1 (66.0%), G2 (12.1%), G4 (8.6%), G3 (3.5%) e G9 (2.7%). A especificidade P dos RVs é mais conservada em todo o mundo; e os tipos mais detectados globalmente são P1A[8], P1B[4] e P2A[6], segundo Hoshino e Kapikian, citados por Santos et al, 2001.

Nas Américas também são encontrados os mesmos tipos, além de G5, G8 e G10 (OSPINO, 2004). Entre os tipos P, os mais freqüentes correspondem a P[4] e P[8], seguidos por P[6] e P[10] (CACERES et al, 2006). Assim, as combinações P e G mais freqüentes são P[8]G1 (40%), P[4]G2 (30%), P[8]G3 (6%) e P[8]G4 (7%) (CASTELO et al, 2004).

Os RVs G5 foram inicialmente reconhecidos como patógenos exclusivos de suínos nos EUA e posteriormente em outros países, como Austrália e Venezuela (GOUVEA e SANTOS, 1997). No Brasil foi isolado pela primeira vez em 1992, a partir de amostras diarréicas de crianças menores de cinco anos de idade (GOUVEA et al, 1994).

Os RVs provenientes de suínos têm sido identificados como tipos G3, G4, G5, e G11 (NAGESHA et al, 1992), e estão associados mais freqüentemente a P[5],



P[6], P[8] e P[7] (SANTOS et al, 1999; RÁCZ et al, 2000; MARTELLA et al, 2001; WINIARCZYK et al, 2002; BARREIROS et al, 2003). P[19], um tipo P raro foi descrito também para a espécie suína (MANEEKARN et al, 2006). Outros tipos G e P esporadicamente encontrados em suínos incluem: G9, P[13], P[23] (TEODOROFF et al, 2005).

O tipo G3 foi descrito como agente causador de diarreia em bovinos (VARSHNEY et al, 2002), murinos (USHIJIMA et al, 1995) felinos, caninos, leporinos, eqüinos e símios, além de suínos (HOSHINO e KAPIKIAN, 1994).

Os tipos G6 e G10 são considerados os mais prevalentes entre bubalinos (CHANG et al, 1995; GULATI et al, 1999; VENDE et al, 1999; KLINGENBERG et al, 1999). Entretanto, G1, G7, G8 e G11 também têm sido associados à infecção por RVs entre esta espécie animal (KAPIKIAN et al, 2001; VARSHNEY et al, 2002; MARTELLA et al, 2003). Os tipos P mais prevalentes entre bovinos são P6[1], P7[5] e P8[11] (CHANG et al 1996; FUKAI et al, 1999; FALCONE et al, 1999; CHANG et al, 2000; OKADA e MATSUMOTO, 2002; VARSHNEY et al, 2002; CIARLET et al, 2002). O tipo P[5] também tem sido considerado o mais prevalente entre búfalos e caprinos na Itália (PRATELLI et al, 1999, GULATI et al, 1999).

Dentre os tipos G mais prevalentes em caprinos destacam-se G3, G6 e G10 (FITZGERALD et al, 1995; PRATELLI et al, 1999; LEE et al, 2003) e dentre os tipos P, P6[1], P5[3] (LEE et al, 2003).

Apesar de poucos casos descritos entre a espécie canina, a combinação G e P prevalente é P5A[3]G3 (SANTOS et al, 1998; NAKAGOMI e NAKAGOMI, 2000; MARTELLA et al, 2001; GABAY et al, 2003).

Dentre os sorotipos G descritos até agora em animais, os mais prevalentes entre eqüinos são G3 (subtipos G3A e G3B) e G14, seguidos por G5, G8, G10 e G13 e G16, este último recentemente descrito na Índia (BROWNING e BEGG, 1996; GULATI et al, 2007). Os tipos P4[11], P14[12] e P12[18] têm sido considerados os mais prevalentes entre esta espécie, seguidos por P4[12] (BROWNING e BEGG et al, 1996; CIARLET et al, 2001).

Entre aves, o tipo P[17]G7 tem sido encontrado como o único tipo em galinhas e perus (ESTES, 2001).

### 2.7.3. Evolução e filogenia molecular

As análises de seqüências de nucleotídeos e da filogenia têm permitido detectar e caracterizar eventos de recombinação entre RVs que ocorrem naturalmente ou que são induzidos em laboratório (WOROBAY e HOLMES, 1999; MARTELLA et al, 2001; PALOMBO, 2002).

De um modo geral, cepas de RVs dentro de um mesmo tipo G compartilham uma identidade de pelo menos 90-91% de similaridade na seqüência de aminoácidos referentes a VP7 (GREEN et al, 1988). Com relação a VP4, cepas com similaridade superior a 89% são classificadas dentro do mesmo genotipo P, enquanto que aquelas que compartilham identidade em relação à seqüência de aminoácidos inferior a 89% pertencem a genotipos diferentes (ESTES, 2001), com maior divergência observada entre os aminoácidos 71 e 204 da VP8\*, a qual está relacionada com a especificidade de VP4 (MARTELLA et al, 2006).

A análise da seqüência de genes de diferentes cepas de RVs sugere um “ancestral” comum para algumas espécies. A relação entre RVs de origem humana e de origem suína, por exemplo, é evidente na filogenia de proteínas e genes estruturais e não-estruturais e pode indicar intercâmbio de genes no passado ou atualmente (PALOMBO, 2002)

## 2.8. Patogênese viral

Os vírus liberados nas fezes podem chegar à ordem de  $10^9$ - $10^{11}$  partículas infecciosas por mililitro de fezes (FLEWETT e WOODE, 1978) e a excreção máxima ocorre entre o 3° e 4° dia após o início dos sinais clínicos (MASCARENHAS, 1999). Água, alimentos e fômites contaminados funcionam como fontes de infecção (MURPHY, 1995) tanto para o homem como para os animais.

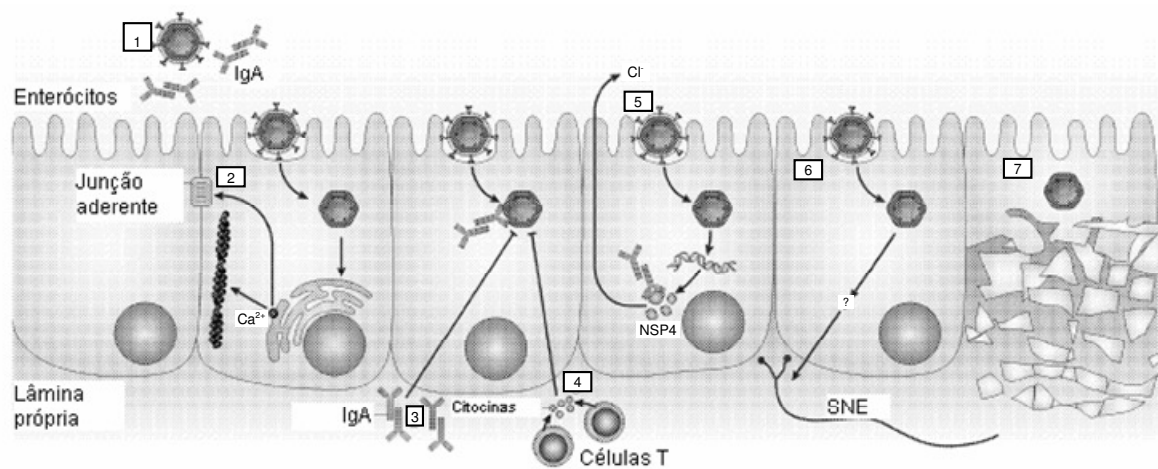
Uma vez no hospedeiro, os RVs resistem ao pH ácido do estômago e alcançam o trato intestinal, onde replicam nos enterócitos de revestimento das vilosidades do intestino delgado (RAMIG, 1994), no duodeno e porção anterior do jejuno (FLEWETT e WOODE, 1978).

Antígenos e partículas infecciosas de RVs já foram descritos em vários órgãos diferentes do intestino: estômago, fígado, pulmões, baço, rins, pâncreas e bexiga. Dentre as alterações histopatológicas observadas nesses órgãos destacam-se inflamação aguda do ducto biliar, infiltrados parenquimais no fígado e nos pulmões. Sua presença em macrófagos pulmonares sugere a possível via de disseminação e expande a ação do vírus além dos limites do trato gastrointestinal (AZEVEDO et al, 2005; CRAWFORD et al, 2006; BLUTT et al, 2007).

Estudos sugerem que a infecção por RVs causa um desligamento da expressão de genes endógenos em favor da de genes virais e, associado à perda de enterócitos maduros através de apoptose e substituição destas células por outras menos diferenciadas, provavelmente conduz a uma disfunção absorptiva do epitélio intestinal (BOSHUIZEN et al, 2003; MARTIN-LATIL et al, 2007).

Além da má absorção, que parece estar relacionada ao dano inicial que o vírus causa sobre o epitélio intestinal e à ação da enterotoxina viral NSP4, os seguintes mecanismos relacionam-se ao quadro diarréico associado aos RVs: ativação e estímulo por parte do Sistema Nervoso Entérico (SNE), que resulta em secreção de eletrólitos e água a partir das células das criptas intestinais; isquemia das vilosidades, que conseqüentemente danifica os enterócitos e aumento da motilidade intestinal, em decorrência da diminuição do tempo de trânsito intestinal (RAMIG, 2004).

De acordo com a Figura 9, anticorpos neutralizantes dirigidos contra VP4 e VP7 podem prevenir a ligação e penetração viral, levando a exclusão viral (Passo 1). Se este mecanismo falha (2) a replicação viral que ocorre dentro dos enterócitos altera o metabolismo das proteínas de membrana destas células, induzindo a diarréia osmótica. Os RVs também aumentam a concentração intracelular de  $Ca^{+2}$ , que rompe o citoesqueleto e as junções aderentes, aumentando a permeabilidade paracelular. Durante o passo 3, a replicação viral pode ser inibida por IgA dirigida contra VP6. A falha deste mecanismo (4) induz a secreção de citocinas por células T, em uma tentativa de impedir a ação do vírus. Se a replicação viral não cessa (5), os RVs produzem NSP4, uma toxina que além de induzir a diarréia, provavelmente estimula o sistema nervoso entérico (SNE), aumentando a diarréia e a motilidade intestinal. Por último (7), a morte das células infectadas, contribui para o agravamento da diarréia (ANGEL et al, 2007).



**Figura 9:** Possíveis mecanismos da diarreia induzida por RVs.

**Fonte:** Angel et, 2007.

## 2.9. Replicação viral

As características gerais da replicação dos RVs incluem:

- A replicação ocorre no citoplasma, no Retículo Citoplasmático e em estruturas específicas conhecidas como viroplasmatas;
- O vírus possui todas as enzimas necessárias a sua replicação;
- Os transcritos funcionam tanto produzindo proteínas, como servindo de molde para a produção da fita negativa, permanecendo associado a esta após a síntese;
- Os segmentos de RNAs de fita dupla são formados dentro da partícula subviral e nunca são observados na forma livre ou fita simples nas células;
- As proteínas do capsídeo externo são adquiridas quando as partículas maduras atravessam a membrana do Retículo Endoplasmático;
- As partículas infecciosas são liberadas por lise celular (ESTES, 2001).

Antes de iniciar a replicação viral, as partículas com tripla camada (TLPs, do inglês “Triple-Layered Particles”) de RVs interagem com receptores celulares (ácido siálico, por exemplo), através do domínio da VP5\* (subproduto da clivagem da VP4), promovendo a penetração viral pela membrana celular. No citoplasma, as TLPs perdem as proteínas VP4 e VP7 (desnudamento) e tornam-se partículas com dupla camada (DLPs, do inglês “Double-Layered Particles”), transcricionalmente ativas. As DLPs consistem em uma camada externa de VP6 e outra interna de VP2 que

encerra os 11 segmentos RNAs de fita dupla, além da VP1 (com atividade de RNA polimerase RNA dependente) e da VP3 (com atividade de capeamento 5' dos RNAs de polaridade positiva) (SILVESTRI et al, 2004; TRASK e DORMITZER et al, 2006) e se acumulam nos viroplasmas.

Os RNAs mensageiros virais (mRNA, do inglês “messenger RNA”) produzidos a partir dos 11 RNAs de fita dupla contidos no interior do cerne são exportados através de canais tipo II que atravessam as camadas de DLPs. As fitas de RNA(+) dirigem a síntese das proteínas virais e servem como molde para a produção de RNA (-) e, posteriormente, para montagem dos RNAs de fita dupla (ESTES, 2001). Os RNAs virais também se acumulam nos viroplasmas.

A proteína não-estrutural NSP4 e as proteínas estruturais VP4 e VP7 são sintetizadas associadas ao Retículo Endoplasmático. NSP4 e VP4 permanecem acopladas de modo transmembranar ao retículo, enquanto VP7 encontra-se em seu lúmen, até o momento da montagem do vírion (MIRAZIMI et al, 2003).

As demais proteínas estruturais (VP1, 2, 3 e 6) e não-estruturais (NSP2, 5 e 6) -sintetizadas no citoplasma - são direcionadas aos viroplasmas para montagem das DLPs. Estas migram dos viroplasmas em direção ao lúmen do Retículo Endoplasmático e quando atravessam a membrana desta organela (pela interação entre NSP4 e VP6), incorporam as proteínas (temporariamente transmembranas) Vp4, VP7 e NSP4, adquirindo um envoltório lipídico. Este envoltório é perdido durante o processo de maturação das novas partículas TLPs formadas, que ocorre no Retículo Endoplasmático e que envolve a reorganização das proteínas VP4 e VP7 para formação do capsídeo externo (ESTES, 2001).

O ciclo termina quando a progênie formada é liberada por lise celular (ESTES, 2001).

## **2.10. Apresentação clínica**

As infecções por RVs produzem vários tipos de respostas, que variam de infecções subclínicas a doença severa e fatal (KAPIKIAN et al, 2001). Inicialmente, observa-se febre e, em seguida, diarreia, podendo ocorrer com ou sem vômito e agravar-se quando associada a microorganismos.

O período de incubação varia de um a sete dias, sendo mais comum em menos de 48 horas (ANDERSON e WEBER, 2004). Os vírus podem ser liberados nas fezes por mais de sete dias (MIDDLETON, 1996; ANDERSON e WEBER, 2004).

Além da apresentação clássica das infecções causadas por RVs, outras manifestações clínicas podem estar presentes. Em um estudo comparativo envolvendo 78 crianças hospitalizadas com diarreia causada por rotavírus e 72 com doença diarreica não associada ao vírus, observou-se que as manifestações clínicas foram mais severas entre o grupo acometido por rotavírus (Tabela 4) (KAPIKIAN et al, 2001).

Achado clínico	Porcentagem de cada achado clínico	
	Infecção relacionada aos RVs	Infecção não relacionada aos RVs
Vômito	96	58
Febre (37,9-39°C)	46	29
Desidratação	83	40
Irritabilidade	47	40
Letargia	36	27
Eritema faríngeo	49	32
Exsudato tonsilar	3	3
Rinite	26	22
Linfonodos cervicais palpáveis	18	9

**Tabela 4:** Característica clínica da rotavirose em crianças hospitalizadas.

**Fonte:** KAPIKIAN et al, 2001.

Em sistemas de produção animal, as enterites podem ser agrupadas como uma síndrome diarreica, uma vez que a presença de mais de um agente patogênico é comum. Fatores imunológicos, ambientais e nutricionais também podem exacerbar a doença (MURPHY et al, 1995). Dentre estes fatores destacam-se idade ao desmame, tamanho do rebanho, tipo de manejo empregado, implantação de programas de vacinação contra rotavírus e forma de aquisição de novos animais (SILVA et al, 1999; DEWEY et al, 2003).

Os animais jovens podem mostrar-se levemente deprimidos e continuar a ingerir o leite materno, recuperando-se dentro de um período de três dias. Contudo, pode ocorrer o óbito como resultado de desidratação ou infecção bacteriana secundária (MURPHY et al, 1995).

## 2.11. Diagnóstico

O diagnóstico de rotavirose não pode ser fundamentado apenas na observação dos sinais clínicos, uma vez que muitas patologias provocam sinais semelhantes. Dessa forma, torna-se necessária a detecção do vírus ou do antígeno viral e/ou a manifestação da resposta sorológica (KAPIKIAN et al, 2001).

A detecção inicial dos RVs baseava-se em técnicas de microscopia eletrônica. Apesar de útil, esta técnica está limitada a laboratórios de pesquisa e referência, principalmente porque o preparo das amostras e a manutenção do microscópio exigem mão-de-obra especializada (WILHELMI et al, 2003).

Apesar de alguns RVs poderem ser isolados em cultivo celular, a utilização desta técnica como ferramenta de diagnóstico não apresenta valor prático, sendo mais utilizada durante pesquisas científicas (KAPIKIAN et al, 2001).

Dentre as técnicas baseadas na detecção de antígeno viral incluem: imunohistoquímica (IHC), aglutinação em látex, EIARA e ensaio imunoenzimático (EIA, do inglês “Enzyme Immunoassay”), sendo estas últimas mais utilizadas em clínicas e hospitais de atendimento a humanos.

Para detecção do genoma viral destacam-se o PAGE, RT-PCR, Hibridização (“dot-blot”) e seqüenciamento. Variações destas técnicas como a RT-PCR em tempo real, por exemplo, são mais restritas a investigações científicas e laboratórios de referência nacional e internacional.

Dentre as técnicas sorológicas utilizadas no diagnóstico de RVs, o ELISA é a mais utilizada, uma vez que possui alta sensibilidade e não requer equipamentos especializados. As demais técnicas sorológicas incluem: radioimunoensaio (RIA, “radioimmunoassay”), imunofluorescência indireta (IFA, “indirect immunoflorescent antibody assay”), dentre outras (KAPIKIAN et al, 2001).

## 2.12. Tratamento, controle e prevenção

O tratamento da rotavirose humana consiste na reposição das perdas hidroeletrólíticas, preferencialmente pela via oral. Em casos mais graves a reidratação venosa pode ser necessária e o uso de antibióticos é considerado inapropriado (PAHO, 2007).

No caso da pecuária, a aplicação de antibióticos para controle de infecções bacterianas secundárias pode auxiliar na recuperação do animal. Melhorias no manejo, tais como desinfecção semanal, limpeza freqüente dos recintos dos animais e da maternidade pode contribuir para a diminuição da incidência de infecções por rotavírus (EMBRAPA, 1987).

Ainda que a adoção de práticas de higiene, abastecimento de água e a eliminação de águas residuais possam contribuir diminuindo a mortalidade associada aos RVs (PAHO, 2007), uma vacina eficiente é a principal meta a ser alcançada para controlar e prevenir a doença, tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento (LINHARES, 2000). Isto porque mesmo em países desenvolvidos que não carecem de infra-estrutura hídrica, a ocorrência de surtos relacionados aos RVs é significativamente relevante .

As primeiras vacinas utilizadas contra infecções humanas por RVs datam da década de 80 e não conferiram proteção, provavelmente devido ao fato de os sorotipos utilizados na vacina (de origem bovina e símica) divergirem dos circulantes. Para contornar este problema, em 1998 foi licenciada uma vacina recombinante - Rotashield (Laboratório "Wyeth Lederle Vaccines and Pediatrics") - composta pelos quatro sorotipos mais prevalentes e epidemiologicamente importantes (G1-G4). Entretanto, a possível associação entre a vacina e o surgimento de intussuscepção intestinal fez com que a comercialização da vacina fosse suspensa e o programa de imunização cancelado (CDC, 1999).

Em 2004 uma nova vacina foi licenciada internacionalmente e incluída no calendário brasileiro de imunizações a partir de 2006. A Vacina Oral de Rotavírus Humano (VORH), comercializada sob o nome Rotarix<sup>®</sup> pelo Laboratório GlaxoSmithKline, é monovalente e elaborada a partir de vírus humanos atenuados cujo sorotipo é P[8]G1 (BRASIL, 2006).

Outra vacina que também se encontra disponível para imunização humana é a Rotateq<sup>®</sup> (Laboratório MERCK); uma vacina pentavalente com os tipos G e P mais comuns entre humanos quais sejam G1, 2, 3 e 4 e P[8] (PAHO, 2003).

Os programas de imunização em espécies animais são empregados, em sua maioria, em regiões endêmicas ou com risco de ocorrência de infecções por RVs. Estes programas estão disponíveis para eqüinos (WILSON, 1999), suínos (DEWEY et al, 2003), bovinos e bubalinos (PISANELLI et al, 2005; MERIAL, 2008).



Apesar de não ser possível erradicar a rotavirose, devido à diversidade de cepas circulantes, que podem ser evolutivamente selecionadas, espera-se que a vacina diminua a severidade de episódios diarréicos subsequentes à imunização, diminuindo as taxas de morbidade e mortalidade e, conseqüentemente, os prejuízos causados por esta virose.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os ensaios deste estudo foram realizados no Núcleo de Análise Genômica da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – Campos dos Goytacazes, RJ.

#### 3.1. Obtenção e viabilidade das amostras

Quatro amostras positivas para RVs e provenientes de suínos foram obtidas e caracterizadas a partir de estudos conduzidos por Xavier (2003), que analisou 226 amostras de fezes no período de 2001 a 2003. Além das amostras de origem suína, duas amostras positivas para RVs foram provenientes de crianças menores de cinco anos, cedidas com consentimento escrito dos responsáveis. Todas as amostras estavam acondicionadas em frascos próprios e armazenadas a -20 °C.

As amostras positivas (Tabela 5) foram re-testadas por PAGE a fim de garantir a viabilidade dos 11 segmentos genéticos característicos dos RVs.

Identificação	Origem da amostra	Classificação por RT-PCR
79	Suína	P[7]G3
179	Suína	P[7]G1G5
204	Suína	P[7]G5
211	Suína	P[1]G5
Hum-1	Humana	P <sup>(a)</sup> G5
Cam-3	Humana	P <sup>(a)</sup> G <sup>(a)</sup>

**Tabela 5:** Identificação das amostras.

<sup>(a)</sup> Sem classificação.

#### 3.2. Extração de RNA de fita dupla

Os RNAs de fita dupla virais foram extraídos com TRIzol<sup>®</sup> LS (Invitrogen Corporation, Carlsbad, Califórnia - USA), com modificações a partir da recomendação do fabricante.

Foram adicionados aproximadamente 250 µL de fezes em um microtubo (capacidade 1,5 mL) contendo 750 µL de TRIzol<sup>®</sup>. Após homogeneização e

incubação à temperatura ambiente durante 15 minutos, foi adicionado 150 µL de clorofórmio e em seguida a mistura foi cetrifugada a 12.000 g durante 10 minutos a uma temperatura de 4°C. A fase aquosa obtida foi transferida para um novo tubo previamente identificado e adicionada de 375 µL de isopropanol. Após 10 minutos de incubação à temperatura ambiente, a mistura foi submetida à centrifugação a 12.000 g/10 minutos/4°C. Ao término desta etapa o sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado uma vez com 1 mL de etanol 75% (v/v) gelado, sendo submetido à homogeneização por vórtex e centrifugação a centrifugar 7.500 g/5 minutos/4°C. Novamente descartou-se o sobrenadante e procedeu-se a secagem do sedimento em banho seco (10 minutos/65°C). Por fim o RNA foi ressuspenseo em 25 µL de água ultrapura.

### 3.3. RT-PCR - Reação em cadeia da polimerase precedida de transcrição reversa

Os RNAs de fita dupla extraídos foram utilizados como molde para obtenção de cDNA, e estes utilizados para a transcrição reversa (RT) (GOUVEA et al, 1990; GENTSCH et al, 1992), com modificações.

Uma alíquota de 3 µL do RNA de fita dupla extraído de cada amostra foi misturada a 1,5 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) e 0,25 µL dos primers Beg9-End9 ou Con3-Con2 (Tabela 6), na concentração de 20 pmol. A mistura foi desnaturada por aquecimento a 95°C durante 5 minutos e rapidamente resfriada em banho de gelo por 3 minutos. A esta mistura foi adicionada a solução mix para RT (Tabela 7), perfazendo um volume final de 15 µL.

Iniciador	Seqüência (5'-3')	Posição (nt)	Tamanho do fragmento (pb)
Beg9	GGCTTTAAAAGAGAGAATTTCCGTCTGG	1-28	1062
End9	GGTCACATCATAAATTCTAATCTAAG	1062-1036	
Con3	TGGCTTCGCCATTTTATAGACA	11-32	876
Con2	ATTCGGACCATTTATAACC	868-887	

**Tabela 6:** Iniciadores utilizados para obtenção dos fragmentos referentes ao gene que codifica VP7, 1062 pb e VP4, 876 pb.

**Fonte:** Gouvea et al 1990; Gentsch et al, 1992.

Reagentes (solução mix)	Volume por reação (1x) - $\mu\text{L}$
5x PCR Buffer (Invitrogen)	5
RNase Out (Invitrogen)	2
dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) 10 mM (Fermentas)	0,5
DTT (Dithiothreitol)	2,5
Super Script II RNase H <sup>-</sup> Reverse Transcriptase (Invitrogen) (40U/ $\mu\text{L}$ )	0,25

**Tabela 7:** Composição da solução mix para RT.

A síntese de cDNA foi conduzida em termociclador a uma temperatura de 42 °C durante 50 minutos.

O cDNA obtido pela RT foi utilizado para amplificação dos segmentos de 876 pb (VP4) e 1062 pb (VP7) , segundo descrito por Gouvea et al (1990) e Gentsch et al (1992), com modificações e uma alíquota de 1  $\mu\text{L}$  dcDNA foi adicionada à solução mix para PCR (Tabela 8).

Reagentes (mix para PCR).	Volume por reação (1x) - $\mu\text{L}$
Água ultra-pura	16,5
DMSO	1,75
10x PCR Buffer	2,5
Mg <sup>2+</sup> 25 mM	1,5
dNTP 10 mM	0,5
Taq Polimerase (Fermentas) (50 U/ $\mu\text{L}$ )	1,0
Beg9-End9 ou Con3-Con2 (20 pmol)	0,25

**Tabela 8:** Composição da solução mix para PCR.

A amplificação foi conduzida em termociclador com a programação de uma desnaturação inicial a 94 °C durante 2 minutos; seguida por 40 ciclos de desnaturação (90 °C/30s), anelamento (42 °C/60s) e extensão (70 °C/90s); e por uma extensão final a 70 °C durante 7 minutos.

### 3.4. Visualização dos produtos da RT-PCR (amplicons)

Uma alíquota de 3  $\mu\text{L}$  de cada amplicon foi submetida à eletroforese em gel de agarose a 0,8% contendo brometo de etila (5 $\mu\text{L}$ /100mL) em tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE: 48,4 g Tris-Base; 11,42 mL Ácido Acético; 20 mL EDTA; pH8,0) e sob voltagem constante de 100 volts durante, aproximadamente, 30 minutos.

Após a eletroforese, o gel foi observado em transiluminador com luz ultravioleta e, posterior à leitura das bandas fluorescentes, foto-documentado utilizando-se o sistema eletrônico EagleEye.

### **3.5. Precipitação, quantificação e seqüenciamento do DNA**

Os amplicons provenientes da RT-PCR foram precipitados com propilenoglicol (PEG), conforme preconizado por Lewis e Metcalf (1988), com modificações.

Uma alíquota de 18  $\mu\text{L}$  de cada amplicon obtido pela RT-PCR foi adicionada a um microtubo (tipo “eppendorf”) contendo 8  $\mu\text{L}$  de NaCl 5M, 14  $\mu\text{L}$  de água ultrapura autoclavada e 40  $\mu\text{L}$  de PEG 8000 (Sigma). A mistura foi incubada a 4°C (geladeira) por um período mínimo de 4 horas. Após esta incubação a mistura foi centrifugada a 10.000 g/4°C/15 min e o sobrenadante descartado ao final do procedimento. Um volume de 500  $\mu\text{L}$  de etanol 70% gelado foi adicionado ao sedimento e o conjunto centrifugado a 10.000 g/4°C/5 min. O sobrenadante foi novamente descartado e o sedimento submetido à secagem a 65°C em banho seco. Por fim o DNA peletizado foi ressuspenso em 10  $\mu\text{L}$  de água ultrapura autoclavada.

O DNA purificado foi quantificado em gel de agarose a 0,8% sob as mesmas condições descritas anteriormente (item 3.4), durante 15 minutos a 80 volts, sendo utilizadas duas amostras de concentrações conhecidas e diferentes (20 ng/ $\mu\text{L}$  e 50 ng/ $\mu\text{L}$ ) para comparação visual.

A seqüência de nucleotídeos dos genes que codificam VP4 e VP7 de RVs foi determinada pelo método de nucleotídeos terminadores de cadeia (método de Sanger-Coulson) utilizando-se o kit “Dyynamic ET Terminator Cycle Sequencing” (Applied Biosystems).

Cada amostra de DNA previamente quantificada foi subdividida em duas para condução do seqüenciamento. Uma solução mix (Tabela 9) foi preparada com os reagentes e o amplicon adicionado a esta mistura.

Reagentes (mix para seqüenciamento)	Volume por reação (µL)
Água ultrapura autoclavada	9
MgCl <sup>2+</sup> 25 mM	6
Premix de seqüenciamento (ET)	2
Amplicon	1
Primer - direto (Beg 9 ou Con3) ou reverso (End 9 ou Con2)	2

**Tabela 9:** Composição da solução mix para seqüenciamento.

A reação de seqüenciamento foi conduzida em termociclador com a programação de uma desnaturação inicial a 96°C/60 s e 25 ciclos, cada um composto por desnaturação a 96°C/20 s, anelamento a 42°C/5 s e extensão a 60°C/4 min.

Após o término da reação de seqüenciamento, as amostras foram precipitadas de acordo com protocolo fornecido pelo fabricante do kit de seqüenciamento (Applied Biosystems), com modificações.

Cada produto da reação de seqüenciamento foi adicionado de 2 µL de acetato de sódio (fornecido juntamente com o kit) e 80 µL de etanol 96%, sendo misturado em vórtex por, aproximadamente, 1 min. O descarte do sobrenadante foi precedido por uma rápida centrifugação a 12.000 g/15 min. Um volume de 100 µL de etanol 70% gelado foi adicionado ao sedimento e uma nova centrifugação a 12.000 g/ 3 min efetuada. Após novo descarte do sobrenadante o sedimento foi submetido à secagem em banho seco (65°/15 min) e ressuspenso em 1,5 µL de formamida, imediatamente antes de ser aplicado no Seqüenciador Automático ABI-Prism 3130 Genetic Analyser do Núcleo de Análise Genômica/UENF.

### 3.6. Análise das seqüências

Após obtenção das seqüências, as mesmas foram montadas utilizando-se os programas Phred/Phrap/Consed em sistema operacional Linux (EWING e GREEM, 1998; EWING et al, 1998; GORDON et al, 1998).

As seqüências montadas foram analisadas pelo BLASTn contra a base de dados do Centro Nacional de Informação Biotecnológica (National Center of Biotechnology Information's - NCBI's, website <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e

alinhas utilizando-se o programa Clustal W 1.8 (website <http://www.ebi.ac.uk>) (TOMPSON et al, 1994).

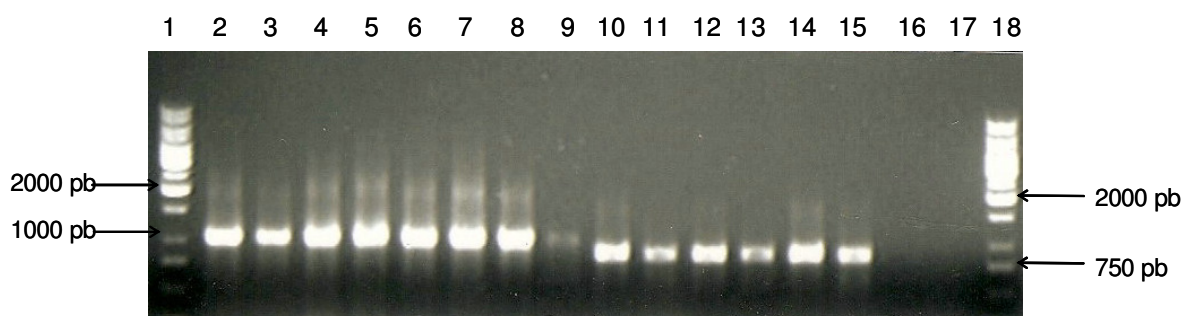
O ajuste das extremidades das seqüências de DNA, de modo que todas tivessem o mesmo número de bases e estivessem alinhadas, foi realizado com auxílio do recurso computacional BioEdit (HALL, 2001). O cálculo da significância estatística de similaridade entre as seqüências foi realizado utilizando-se uma reamostragem para 1000 replicações (SWOFFORD et al, 1996). O método de distância (“Neighbour Joining”) (SAITOU e NEI, 1987) foi utilizado para construção da árvore filogenética com auxílio do programa TREECON (PEER, 2001).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. RT-PCR

Todas as amostras testadas (n=6) produziram o fragmento de tamanho esperado para o gene que codifica VP7 (1062 pb). Entretanto, somente três amostras renderam fragmentos de 876 pb, referentes à região VP8\* do gene 4, quando submetidas a RT-PCR (Figura 10).

O gene que codifica VP4 não foi amplificado nas amostras Hum-1 e Cam-3. Apesar da amplificação do gene de VP7, a amostra Cam-3 não foi caracterizada quanto ao genotipo G. Diante destes resultados, os genes de VP4 das amostras Hum-1 e Cam-3 e o gene de VP7 da amostra Cam-3 não foram submetidos ao seqüenciamento.



**Figura 10:** Eletroforese em gel de agarose 0,8 % com brometo de etila, dos produtos amplificados pela RT-PCR de rotavírus provenientes de amostras fecais de origem humana e suína.

Linhas 1 e 18: marcador de peso molecular (1kb, Fermentas®).

Linhas 2 a 9: produtos de 1062 pb. Amostra 79 (linhas 2 e 3), 204 (4 e 5), 211 (6 e 7), Hum-1 (8 e 9).

Linhas 10 a 17: produtos de 876 pb. Amostra 79 (linhas 10 e 11), 204 (12 e 13), 211 (14 e 15), Hum-1 (linhas 16 e 17).

Nota: não são mostrados os amplicons das amostras 179 e Cam3.

A falha em se amplificar genes codificadores de VP4 e VP7 de RVs tem sido observada em vários estudos envolvendo RT-PCR. Iturriza-Gómara et al (2004) descrevem métodos e primers desenvolvidos para caracterizar genotipicamente



cepas de rotavírus previamente classificadas como G3 e que falharam na classificação para o tipo P. Segundo os autores, embora a RT-PCR esteja bem estabelecida como método para caracterização dos RVs, se faz necessário a atualização e revisão regular dos reagentes e métodos utilizados, considerando-se os mecanismos evolutivos destes vírus. Martella et al (2005) e Heide et al (2005) também correlacionaram alterações ocorridas na RT-PCR com variações nas seqüências de nucleotídeos de RVs, na Itália. Nestes estudos foram seqüenciadas amostras não caracterizadas por PCR ou que não foram passíveis de amplificação pelo mesmo método.

Fischer et al (2003) descrevem algumas possíveis explicações para falha de caracterização de RVs por RT-PCR, dentre elas mutações pontuais em locais de ligação dos primers, que podem alterar, inclusive, a caracterização de amostras consideradas resultado de infecções mistas. Quando estes autores submeteram amostras consideradas mistas para o tipo G (G3-G8) ao seqüenciamento, identificaram o genotipo G8 a partir da análise das seqüências de nucleotídeos. Infelizmente, neste presente estudo, a amostra 179, caracterizada por RT-PCR como mistura de G1-G5P[7] não foi submetida ao seqüenciamento, devido à pequena quantidade de fezes disponível.

O acúmulo de mutações pontuais dentro da região de pareamento do primer pode explicar a falha para amplificação dos fragmentos correspondentes nas amostras Hum-1 (para o gene codificador de VP7) e Cam-3 (para os genes codificadores de VP4 e VP7). O par de primers Con3-Con2 utilizado neste estudo foi desenhado no ano de 1992 por Gentsch et al e é específico para regiões conservadas do genoma viral. Para classificação do gene codificador da proteína VP7 (tipo G) foi utilizado o par de primers Beg9-End9 desenhado em 1990 por Gouvea et al. Alguns relatos demonstram que estes primers podem falhar na detecção de novas cepas de RVs (GRIFFIN et al, 2002; FISCHER et al, 2003; ITURRIZA-GÓMARA et al, 2004; HEIDE et al, 2005; MARTELLA et al, 2005).

A qualidade do RNA extraído também interfere no êxito da transcrição reversa e amplificação a partir de cDNA e, pode ter sido igualmente responsável pelas falhas na amplificação dos produtos analisados neste estudo (MANIATIS et al, 1992).

## 4.2. Seqüenciamento

Dentre as amostras analisadas, somente aquelas identificadas como 79G, 204G e Hum-1 foram eficientemente seqüenciadas para o produto de amplificação do gene que codifica VP7. As seqüências obtidas foram editadas com auxílio do recurso computacional BioEdit (HALL, 2001), excluindo-se parte das extremidades 5´ e 3´, em decorrência da baixa qualidade do seqüenciamento.

Seqüência do gene codificador de VP7 da amostra 79 – tamanho do fragmento: 1002 pb  
 GATTTTAGAATCATGTATATGCTGCTGTATTTAATGACCGTGATCTTTTGGACATAACTTGTACAATCTGACCC  
 TTCTGAGGTACCACTGTATAGAAAACCTTGCCACCATTTCTTCCCATTTAGTCGCATCATACGCTCAGTTTGTG  
 GTGTAGTAGTTGGATCCGCGTAATATCTAACACTTCTGAGCCACCGACTTGTATAATTGCTACGTTCTCTCT  
 TGGTCCTAACTTCTTACAATTTCTAATCGTACAGGATTTGTAGTTACATCAAGTTTATGATTCACACCGTCAA  
 CGACATCGGTTATTACCAATTTTTACCTGTAGCCACTTCTTCAAATGTCGCTGCATTTGTAGTAGTACAACCT  
 ATTCCCAAAGTCTGTGTATTCAATGGACATACTTTTATGGTACAAGACTGTCCCATTGATATCCATTTATTTCGC  
 TTCATCCGTTTGGCTGATAATAATAATGTTATATCCATTGGGTTACATAACCATTCAATTTAAAATCAGATCAGC  
 CAATTCAGACATATCTAATTCTAACGTTGAATCATACTTCATCAGTACAACATTATAATCACAGTAAAGTTGTG  
 GGTAATTGAGAATGAAGCGATATCGGTATATTCTTTAAAATAGACTGATCCAGTTGGCCACCCCTTAGTCAA  
 GAATAATTGAGACAGAGTATCTTTCCATTCCGTCTCCAATTTGAGTTGATGCTTCAGTAGGATAATATAAGC  
 ATAGCGTTGAAGTTAAAATGTTTCTTGTGCGACGAATTCGCATATGCTGTGTCCATAGAGCCAGTGATTGG  
 TAAATTAATTCATAATTTTGCCTTTAACAAATGGTGACACAATAACAATAAGTAGAAGAAATCGACAAAAGGA  
 TAAAGTCCATCGCACTAGTTAGTGATTTTAACTGTAAAAGGGTAAAATTATTGATATCAGAAAGGTTAGAAT  
 GTGGTATATGCAATATCATACATAATAGAGTTTATCAAATGGG

Seqüência do gene codificador de VP7 da amostra 204 – tamanho do fragmento: 890 pb  
 AGCGTGATCGCTTGGACATGACTTGCACAATCTGATTGACGTAATCAACTATTGTATAAAAAGACTTGGCCACCA  
 CCTCTTCCAATTTATACGCATCATTCTTTCAGTCTGTGGTGCAGTTGTTGGATCAGCTGTTATGTCGAGTACAT  
 TTGGACCTCCACCTGAATCACAGCAACGTTTTCTTGGTCCAAGTTTTTACAATTTCTTATGGTGCATGTA  
 CTCGTTGTTACGTCCAATTTGTGATTAECTCCATCGACAACATCAGTTATAGCTAGTTTCTCTGCATTAGCGAC  
 TGTTTCAAATGAATTTACGTCTGTAGTCGAACACCCTATTCCGAGAGTCTGTGTATTTAAGGGACATACTTTAA  
 TTGTACATGATGCGCCCATTGATATCCATTTGTTAGCTTCATCTGTTTGTGATAATAATATAGCGTTATATCCA  
 TTGGATTACATAGCCATTCATTCAATATTTAAATCAGCCAACTCAGACATATCTAGCTGTAAATTTCCATCATACT  
 TCATTAGTACAATATTATAGTCACAATAAATGTTGGTCTACAGAAAATGACGCGATATCTGCATCCCCTTTA  
 AAATAAACTGACCCCGTTGGCCATCCTTTTGTAGGAACAACCTGCGATAATGTTTCCGTCCATTTTGCATCTG  
 CAATTTCTGTAGCTGCTTCATTTGGATAATATAGACATAATGTTGAAGTTAAAATGTTTCACTTGTAGTGGAAT  
 TCATATATGGCGTATCCATAGATCCAGTTATTGGTAAATTAATTCGTAATTTTGGAGCTTTAATAAGTGGTGCA  
 AGTATGACTATAATCAATAAAAAACCTATAAATGATAAAGTCCATTATTCTGATAACTGATTTTCAGTATATAATTA

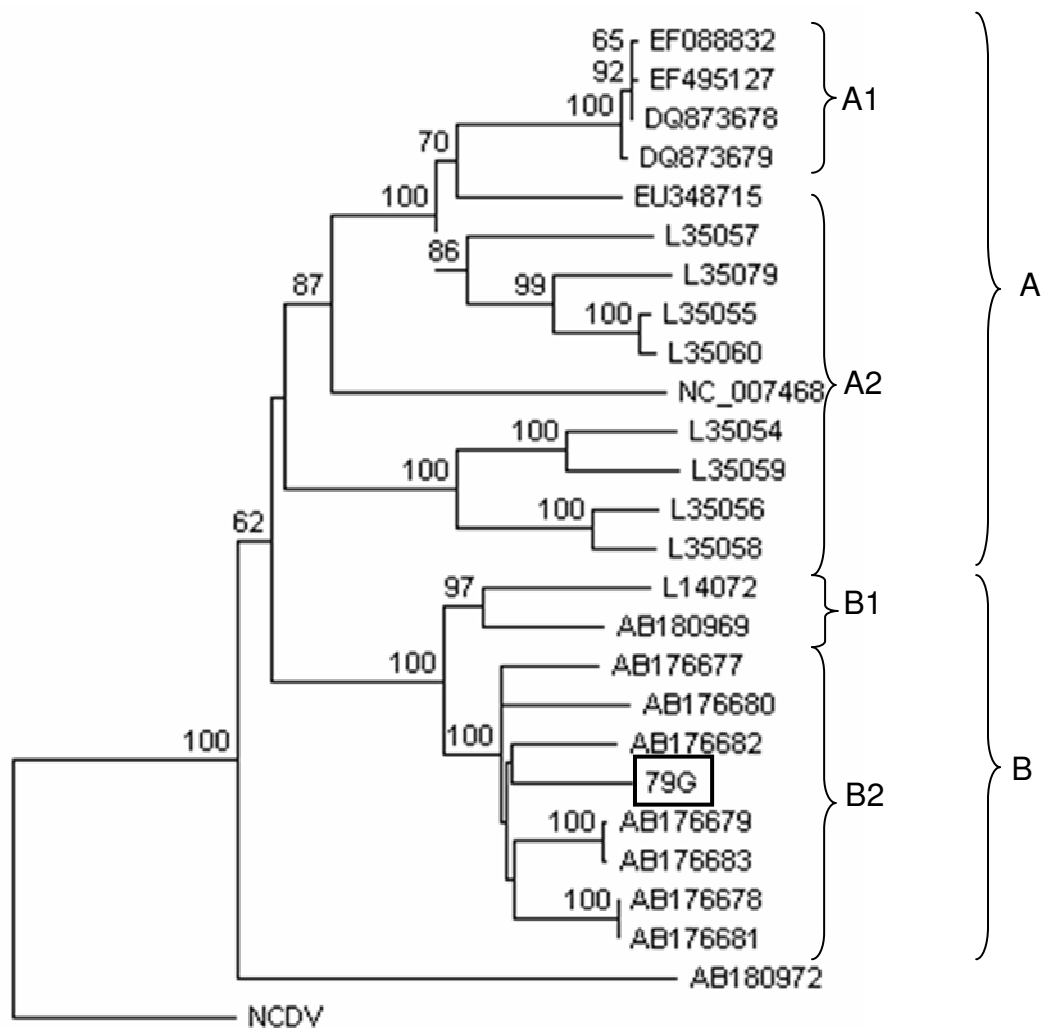
Seqüência do gene codificador de VP7 da amostra Hum-1 – tamanho do fragmento: 944 pb  
 TATACCACAATTCTAATCTTTCTGATATCAATCATTCTACCCAACTATATATTTAAAATCAGTACTCGAATGATG  
 GACTACATTCTTTATAGATCTTTGTTGATTTCTGTAGCATTATTTGCCTTGACAAGAGCTCAGAATTATGGACTT  
 AACTTACCAATAACAGGATCAATGGACACTGCATACGCTAACTCTACTCAAGAAGGAATATTTCTAACATCCA  
 CATTATGTTTGTATTATCCAACCTGAAGCAAGTACTCAAATTAATGATGGTGAATGGAAGACTCATTGTACACA  
 ATGTTTCTCACAAAAGGTTGGCCAACAGGATCAGTCTATTTTAAAGAGTATTCAAGTATTGTTGATTTTTCTGT  
 TGATCCACAATTATATTGTGATTATAACTTAGTACTGATGAAATATGATCAAAATCTTGAATTAGATATGTCAGA  
 GTTAGCTGATTTAATATTGAACGAATGGTTGTGTAATCCAATGGATATAACATTATATTATTATCAACAATCGG  
 GAGAATCAAATAAGTGGATATCAATGGGATCATCATGTACTGTGAAAGTGTGTCCACTGAATACGCAAACGTT  
 AGGAATAGGTTGTCAAACAACAAATGTAGACTCGTTTGAATGGTTGCTGAGAATGAGAAATTAGCTATAGTA  
 GATGTCGTTGATGGGATAAATTATAAGATAAATTTGACAACCTACGACATGTACTATTGAAATTTGAAAAAATT  
 GGGTCCAAGAGAGAATGTAGCTGTAATACAAGTTGGTGGCTCAATGTATTAGACATAACAGCAGATCCAAC  
 GACTAATCCACAAAACCTAGATGAGAGTGAAGGGAAAAAATGGTGGCAAGTTTTATACTATAGTA  
 CCTAGATAGAGGTCAGATCGTGCAGGTAATGTCCAAAAGATCAAGATCATTAAATTTCTG

Utilizando-se a ferramenta de comparação de seqüência de nucleotídeos Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), a amostra 79G, previamente classificada por RT-PCR como G3, foi alinhada com várias seqüências do gene que codifica a

proteína VP7 de RVs de origem suína e humana (Tabela 10), sendo, em seguida classificada como G9 (Figura 11).

Acesso no GenBank	Cepa isolada	Origem	Tipo G
DQ873678	Y111	Humana	3
DQ873679	L226	Humana	
EF088832	5290	Humana	
EF495127	RUS79	Humana	
AY707788	CMP039	Suína	
L35079	A138	Suína	
L35060	A411	Suína	
L35059	A34	Suína	
L35058	C134	Suína	
L35057	-	Suína	
L35056	CC117	Suína	
L35054	A46	Suína	
NC_007468	B4106	Humana	
EU348715	P50	Suína	9
AB176677	HOKKAIDO-14	Suína	
AB176680	JP16-3	Suína	
AB176679	JP13-3	Suína	
AB176683	JP35-7	Suína	
AB176682	JP32-4	Suína	
AB176681	JP29-6	Suína	
AB176678	JP3-6	Suína	
AB180969	WI-61	Bovina	
L14072	116E	Humana	
AB180972	O-1	Suína	6
M63266	NCDV	Bovina	

**Tabela 10:** Cepas de RVs classificados como G3 e como G9 de origem suína e humana utilizadas neste estudo.



**Figura 11:** Dendrograma para a amostra 79, obtida pelo método do vizinho mais próximo (neighbour-joining), de acordo com a seqüência de nucleotídeos de RVs G3 e G9, de origem suína e humana. A cepa NCDV (G6) foi utilizada como raiz para grupo externo. Os valores de bootstrap (%) são mostrados. As cepas estão referenciadas na Tabela 10.

De acordo com a Figura 11, observa-se a formação de dois grandes grupos, A e B, com algumas particularidades. O grupo A corresponde aos RVs G3 e exceto pela cepa humana número de acesso B4106 (acesso nº NC\_007468), dividi-se em dois subgrupos distintos, A1 (humano) e A2 (suíno). B4106 mostra-se como um grupo isolado devido ao fato de não somente seu gene codificador de VP7, como os demais segmentos genômicos compartilharem elevado nível de identidade com cepas de RVs de origem leporina, diferindo sobremaneira de outras cepas de origem humana (MATTHIJNSSENS et al, 2006).

Dentro deste grupo observa-se ainda uma grande diversidade entre cepas de origem suína, comprovada pela formação de pequenos subgrupos internos (A2).

O grupo B subdivide-se de acordo com a origem das cepas de RVs em B1 (origem humana) e B2 (origem suína). Com relação ao subgrupo B1, vale ressaltar que a cepa 116E (acesso nº L14072) é resultado provável de reagrupamento entre a cepa humana Wa e a cepa bovina KK3 (DAS et al, 1993). A mesma diversidade entre cepas de origem suína observada no subgrupo A2 é novamente comprovada para o subgrupo B2.

A análise das seqüências de genes de RVs provenientes de diferentes espécies tem mostrado uma relação genética que sugere um ancestral comum para algumas espécies. A relação entre cepas humanas e suínas, particularmente, é evidente na filogenia de genes que codificam proteínas estruturais e não-estruturais, indicando um intercâmbio de genes entre estas espécies, que pode ter ocorrido no passado e ainda estar ocorrendo (PALOMBO, 2002).

A amostra 79G foi agrupada junto com as demais cepas de RVs de origem suína e classificada como G9, ainda que tenha sido caracterizada por RT-PCR como G3. Este resultado sugere que esta amostra apresenta mutações que possam interferir na caracterização por RT-PCR. Entretanto, uma melhor avaliação é necessária para confirmar esta hipótese.

O nível de homologia entre a amostra 79G e as demais foi maior entre cepas de origem suína e provenientes do Japão. Santos et al (2001) encontraram resultado semelhante ao analisarem 157 amostras positivas de RVs provenientes de crianças menores de cinco anos de idade, internadas ou atendidas em ambulatórios do estado do Rio de Janeiro, durante 1997 e 1999. No referido estudo, entretanto, os autores observaram elevada similaridade genética entre cepas de procedência brasileira e classificadas como G3P[9] e o vírus AU-1 de procedência japonesa, que por sua vez é geneticamente similar aos RVs felinos, o que sugere uma infecção zoonótica envolvendo cepas humana e felina. Infelizmente, no presente estudo não foi possível correlacionar a ocorrência do genotipo G9 com a presença de felinos na propriedade onde a amostra 79G foi coletada. Entretanto, levando-se em consideração os mecanismos evolutivos que favorecem a diversidade de RVs, é possível que tal similaridade observada seja resultado de recombinação genética interespecies com ou sem a participação de felinos como hospedeiros intermediários.

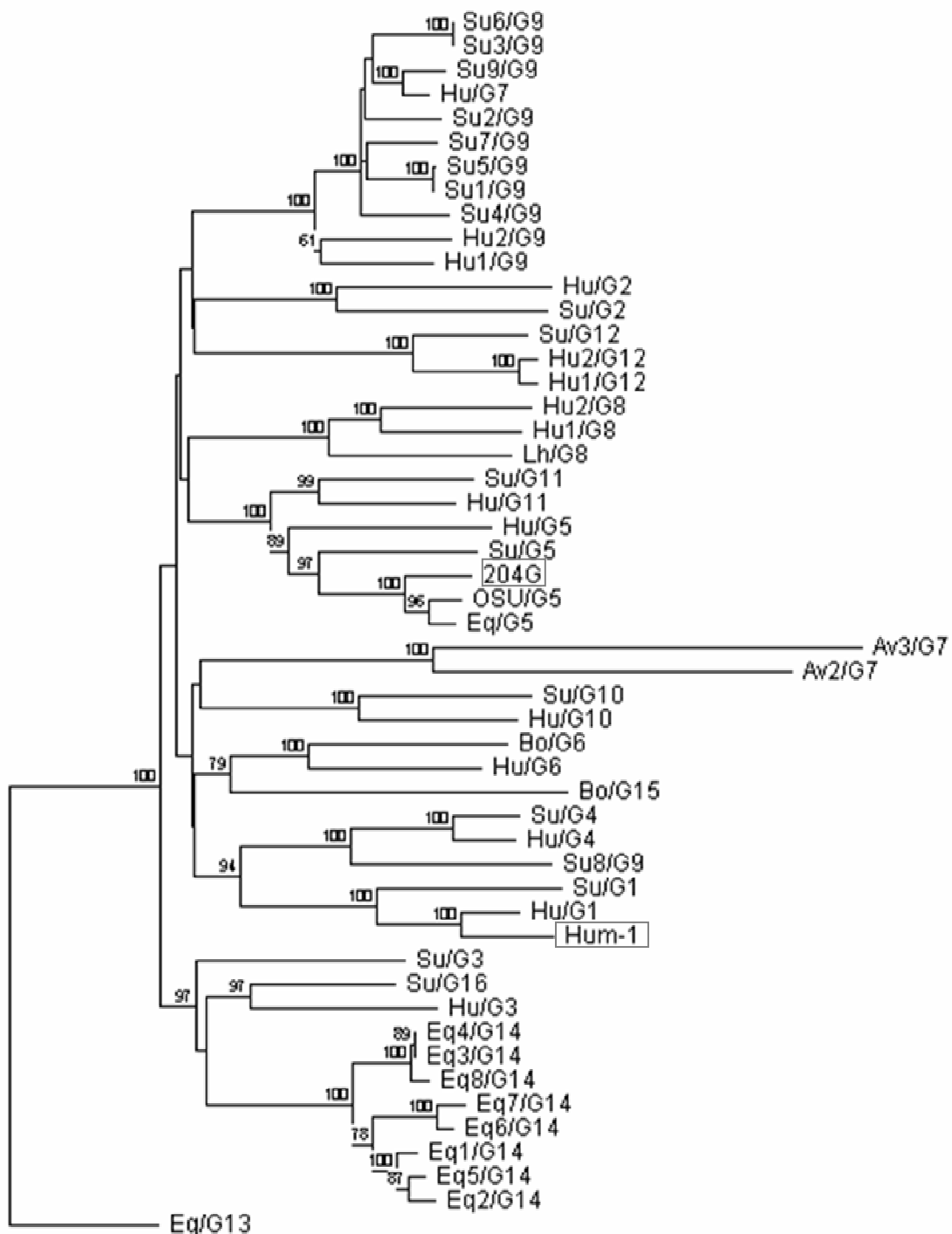
A similaridade entre cepas de procedência brasileira e asiática também foi observada em estudo conduzido por Wang et al (2007), que avaliaram os genotipos

de maior ocorrência em adultos e crianças com diarreia, entre os anos de 2001 e 2006. No referido estudo as cepas G9 agruparam-se com outros tipos G9 dos Estados Unidos, Brasil, Índia, Bangladesh, Tailândia, Austrália, Itália e alguns países da África, compartilhando níveis de homologia entre 97-99%.

As amostras 204G e Hum-1, ambas classificadas por RT-PCR como G5 foram alinhadas com cepas de RVs de diferentes tipos G (Tabela 11), utilizando-se a ferramenta Blast, previamente descrita.

Acesso no GenBank	Origem/tipo G	Acesso no GenBank	Origem/tipo G
D16328	Hu1/G1	AF039524	Lh/G8
EF199723	Hu/G2	AB176683	Su1/G9
NC_007468	Hu/G3	AB176682	Su2/G9
EU139427	Hu/G4	AB176681	Su3/G9
AB257126	Hu/G5	AB176680	Su4/G9
AF421183	Hu/G6	AB176679	Su5/G9
AB272753	Hu1/G8	AB176678	Su6/G9
AY855064	Hu2/G8	AB176677	Su7/G9
AB180969	Hu1/G9	AB176672	Su8/G9
L14072	Hu2/G9	AY707787	Su9/G9
AY843333	Hu/G10	U35850	Su/G10
AB264007	Hu/G11	L24163	Su/G11
EU284736	Hu1/G12	DQ204743	Su/G12
EF059917	Hu1/G12	DQ13549	Eq/G13
L24164	Su/G1	AY750923	Eq1/G14
DQ534015	Su/G2	D25229	Eq2/G14
DQ786577	Su/G3	L49042	Eq3/G14
DQ683521	Su/G4	AB046468	Eq4/G14
DQ515961	Su/G5	U05348	Eq5/G14
X04613	OSU/G5	U05349	Eq6/G14
AF242393	Eq/G5	AB046467	Eq7/G14
M63266	Bo/G6	M61876	Eq8/G14
S58166	Av2/G7	AF237666	Bo/G15
X56784	Av3/G7	DQ981479	Su/G16

**Tabela 11:** Cepas de RVs utilizadas neste estudo. Hu=humana, Su=suína, Eq=eqüina, Bo=bovina, Lh=Lhama (camelídeo), Av=ave (peru e galinha). OSU corresponde ao protótipo suíno do grupo G5.



**Figura 12:** Dendrograma para as amostras 204G e Hum-1, obtida pelo método do vizinho mais próximo (neighbour-joining), de acordo com a sequência de nucleotídeos de RVs G5 de origem suína e humana. O representante Eq/G13 foi utilizado como raiz para grupo externo. Os valores de bootstrap (%) são mostrados. As cepas estão referenciadas na Tabela 11.

De acordo com a Figura 12, a amostra 204G foi agrupada junto com outras cepas de RVs G5, mostrando elevada homologia (94%) com a cepa eqüina (H-1) (dados não mostrados). Esta cepa eqüina representa um exemplo de possível transmissão interespecies de suínos para eqüinos, conforme observado em estudos conduzidos por Ciarlet et al (2001), onde foram analisadas as seqüências dos genes codificadores das proteínas estruturais VP4, VP6, VP7 e não-estruturais NSP1 e NSP4, constatando-se elevada similaridade com o protótipo suíno OSU.

O genotipo G5 já está bem estabelecido como prevalente entre amostras de RVs de origem suína e de origem humana, particularmente no Brasil. Estudos conduzidos por Gouvea et al (1994) demonstraram pela primeira vez a ocorrência deste genotipo nos estados do Rio de Janeiro, São Paulo, Pernambuco e Goiás, entre crianças com diarréia e com uma prevalência de 4,6% (n=329). Desde então, o genotipo G5 vem sendo considerado de importância epidemiológica, tanto no Brasil como em outros países da América do Sul (SANTOS e HOSHINO, 2005).

Em suínos, G5, G3, G4 e G11 têm sido considerados os tipos mais prevalentes em todo o mundo (ROSEN et al, 1994), ainda que G9 tenha emergido no início dos anos 90 (TEODOROFF et al, 2005).

Um dado interessante deve-se ao fato da amostra 204G apresentar maior nível de identidade com a cepa eqüina H-1 do que com a cepa suína OSU (93%). Entretanto, uma análise mais detalhada, incluindo o seqüenciamento de todos os 11 segmentos genômicos da amostra 204G deve ser realizada para explicar tal similaridade, uma vez que o agrupamento dos três isolados em um mesmo ramo do dendograma era esperado.

O dendograma permite ainda observar a manutenção da identidade entre os tipos G5 e G11, já comprovada por um estudo conduzido por Timenetsky et al (1997). As autoras sugerem que cepas suínas G5 e G11 podem ter evoluído a partir de uma cepa em comum (de origem humana ou suína), apresentando assim especificidade sorológica para G5 e G11. Este resultado reforça os possíveis mecanismos evolutivos que permitem o surgimento de novas cepas de RVs.

Com relação à amostra de origem humana analisada neste estudo, Hum-1, observa-se que a mesma foi classificada como G1, apesar da análise por RT-PCR indicar o genotipo G5. Quando submetida ao agrupamento com outras cepas de RVs G5, tanto de origem humana como suína, a amostra Hum-1 não forma um



cluster com estas cepas (dados não mostrados), comprovando sua diferença genética.

A ocorrência de G1, G2, G3 e G4 entre amostras de origem humana representa mais de 88% das cepas analisadas em todo mundo (SANTOS E HOSHINO, 2005). Apesar de somente uma amostra de origem humana neste estudo, pode-se inferir que o tipo G1 circulante é o mesmo utilizado como alvo nos programas de imunização contra RVs adotados no mundo todo. No Brasil, desde março de 2006 foi adotado o programa de imunização nacional com a Vacina Oral de Rotavírus Humano (VORH), licenciada no mercado internacional com o nome de Rotarix® e fabricada pelo Laboratório GlaxoSmithKline. Esta é uma vacina elaborada com vírus isolados de humanos e atenuados e é monovalente, ou seja, a cepa RIX4414 utilizada possui apenas um sorotipo em sua composição que é o G1[P8] (Brasil, 2006).

A estreita relação genética entre amostras suínas e humanas, principalmente no Brasil, é muitas vezes relacionada a condições sanitárias inadequadas e ao contato muito próximo entre humanos e animais domésticos, incluindo suínos (MASCARENHAS et al, 2007). No presente estudo não foi possível tal correlação, haja vista que nas propriedades onde as amostras foram coletadas não se procedeu a coleta de fezes humanas.

## 5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

- ✓ A análise das seqüências de 79G e Hum-1 permitiu a classificação destas amostras como G9 e G1. Estes resultados demonstram a importância em se proceder ao seqüenciamento das amostras de RVs circulantes, principalmente nos casos em que resultados obtidos por RT-PCR possam ser considerados conflitantes.
- ✓ A diversidade genética característica dos RVs foi confirmada neste estudo através da similaridade de seqüências observada entre a amostra 79G e a cepa japonesa JP32-4. Os mecanismos genéticos que favorecem esta diversidade devem ser melhor avaliados com o intuito de contribuir para a compreensão da ecologia dos RVs.
- ✓ O desenho de novos primers se faz necessário para caracterização das amostras 79 (tipo P), 179 (tipos G e P), 204 (P), 211 (G e P), Hum-1 (P) e Cam-3 (G e P), com posterior seqüenciamento para monitoramento e entendimento das relações genéticas que possam ter ocorrido entre estas.
- ✓ A pesquisa de RVs entre animais deve ser incentivada, uma vez que estes podem servir como reservatórios e transmissores desta virose para os humanos, ocasionando prejuízos consideráveis no âmbito da saúde pública.

## 6. REFERÊNCIAS

- AHMED, K.; NAKAGOMI, T.; NAKAGOMI, O. Molecular identification of a novel G1 VP7 gene carried by a human rotavirus with a super-short RNA pattern. **Virus Genes**, v. 35, p. 141-145, 2007.
- ANGEL, J.; FRANCO, M. A.; GREENBERG, H. B. Rotavirus vaccines: recent developments and future considerations. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, p. 529-539, 2007.
- AZEVEDO, M. S.; YUAN, L.; JEONG, K-I.; GONZALEZ, A.; NGUYEN, T. V.; POULY, S.; GOCHNAUER, M.; ZHANG, W.; AZEVEDO, A.; SAIF, L. Viremia and nasal and rectal shedding of rotavirus in gnotobiotic pigs inoculated with Wa human rotavirus. **Journal of Virology**, v. 79, n. 9, p. 5428-5436, 2005.
- BANERJEE, I.; ITURRIZA-GOMARA, M.; RAJENDRAN, P.; PRIMROSE, B.; RAMANI, S.; GRAY, J. J.; BROWN, D. W.; KANG, G. Molecular characterization of G11P[25] and G3P[3] Human rotavirus strains associated with asymptomatic infection in South India. **Journal of Medical Virology**, v. 79, p. 1768-1774, 2007.
- BLUTT, S. E.; MATSON, D. O.; CRAWFORD, S. E.; STAAT, M. A.; AZIMI, P.; BENNETT, B. L.; PIEDRA, P. A.; CONNER, M. E. Rotavirus antigenemia in children is associated with viremia. **PLoS Medicine**, v. 4, n. 4, p. 660-668, 2007.
- BOSHUIZEN, J. A.; REIMERINK, J. H. J.; MALE, A. M. K.; HAM, V. J. J. V.; KOOPMANS, M. P. G.; BULLER, H. A. DEKKER, J.; EINERHAND, A. W. C. Changes in small intestinal homeostasis, morphology, and gene expression during rotavirus infection of infant mice. **Journal of Virology**, v. 77, n. 24, p. 13005-13016, 2003.
- BOTH, G. W.; BELLAMY, A. R.; MITCHELL, D. B. Rotaviruses protein structure and function. In: RAMIG, R. F. (Org.). **Rotaviruses**, Houston, 1994. p. 68-93.
- BRASIL; Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Doença diarreica por rotavírus: Vigilância epidemiológica e prevenção pela vacina oral de rotavírus humano – VORH: informe técnico. Brasília: Ministerio da Saúde; 2006, p 1-36.

- CÁCERES, D. C.; PELÁEZ, D.; SIERRA, N.; ESTRADA, E.; SÁNCHEZ, L. La carga de la enfermedad por rotavirus en niños menores de cinco años, Colombia, 2004. **Pan Am J Public Health**, v. 20, n. 1, p. 9-21, 2006.
- CASTELLO, A. A.; ARVAY, M. L.; GLASS, R. I. Gentsch J. Rotavirus strain surveillance in Latin America: a review of the last nine years. **Pediatr Infect Dis J**, v. 10, p. 168-172, 2004.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Rotavirus vaccine for the prevention of rotavirus gastroenteritis among children: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). **Morbidity and Mortality Weekly Report**. v. 48, n. 2, p. 1-23, 1999.
- CIARLET, M.; ISA, P.; CONNER, M.E.; LIPRANDI, F. Antigenic and molecular analyses reveal that the equine rotavirus strain H-1 is closely related to porcine, but not equine, rotavirus: interspecies transmission from pigs to horses? *Virus Genes*, 22(1): 5-20, 2001.
- CIARLET, M.; HYSER, J. M.; ESTES, M. K. Sequence analysis of the VP4, VP6, VP7 and NSP4 gene products of the bovine rotavirus WC3. **Virus genes**, v. 24, n. 2, p. 107-118, 2002.
- CRAWFORD, D. E.; PATEL, D. G.; CHENG, E.; BERKOVA, Z.; HYSER, J. M.; CIARLET, M.; FINEGOLD, M. J.; CONNER, M. E.; ESTES, M. K. Rotavirus viremia and extraintestinal viral infection in the neonatal rat model. **Journal of Virology**, v. 80, n. 10, p. 4820-4832, 2006.
- CUNLIFFE, N. A.; GENTSCH, J. R.; KIRKWOOD, C. D.; GONDWE, J. S.; DOVE, W.; NAKAGOMI, O.; NAKAGOMI, T.; HOSHINO, Y.; BRESEE, J. S.; GLASS, R. I.; MOLYNEUX, M. E.; HART, C. A. Molecular and serologic characterization of Novel Serotype G8 Human Rotavirus Strains Detected in Blantyre, Malawi. **Virology**, v. 274, p. 309-320, 2000.
- DESSELBERGER, U.; McCRAE, M. A. The rotavirus genome. In: RAMIG, R. F. (Org.). **Rotaviruses**, Houston, 1994. p. 31-51.
- DEWEY, C.; CARMAN, S.; PASMA, T.; JOSEPHSON, G.; MCEWEN, B. Relationship between group A porcine rotavirus and management practices in swine herds in Ontario. **Can Vet J**, v. 44, p. 649-653, 2003.

- ESTES, M. Rotaviruses and their replication. In: Bernard, N. F.; David, M. K.; Peter, M. H. (Org.). **Fields Virology**. 3. ed. Philadelphia, 2001. p1625-1647.
- EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Research**, Woodbury, v.8, p. 186-194, 1998.
- EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M. C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, Woodbury, v. 8, p. 175-185, 1998.
- FLEWETT, T. H.; WOODE, G. N. The rotaviruses. **Archives of Virology**, v. 57, p. 1-23, 1978.
- FUKAI, K.; TAKAHASHI, T.; TAJIMA, K.; KOIKE, S.; IWANE, K.; INOUE, K. Molecular characterization of a novel bovine group A rotavirus. **Veterinary Microbiology**, v. 123, p. 217-224, 2007.
- FUKAI, K.; SAKAI, T.; HIROSE, M.; ITOU, T. (1999) Prevalence of calf diarrhea caused by bovine group A rotavirus carrying G serotype 8 specificity. *Veterinary Microbiology*, 66: 301-311.
- FUKAI, K.; ONODA, H.; ITOU, T.; SATO, M.; MIURA, Y.; SAKAI, T. Genetic and serologic characterization of novel serotype G8 bovine group A rotavirus strains isolated in Japan. **J. Vet. Med. Sci.**, 66(11): 1413-1416, 2004.
- GABBAY, Y. B.; HOMEM, V. S. F.; MUNFORD, V.; ALVES, A. S.; MASCARENHAS, J. D. P.; LINHARES, A. C.; RÁCZ, M. L. Detection of rotavirus in dogs with diarrhea in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 77-80, 2003.
- GENTSCH, J.; DAS, B. K.; JIANG, B.; BHAN, M. K.; GASS, R. I. Similarity of the VP4 protein of human rotavirus strain 116E to that of the bovine B223 strain. **Virology**, v. 194, p. 424-30, 1993.
- 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. *Journal of Clinical Microbiology*, 30 (6): 1365-1373.
- GENTSCH, J. R., A. R. LAIRD, B. BIELFELT, D. D. GRIFFIN, K. BANYAI, M. RAMACHANDRAN, V. JAIN, N. A. CUNLIFFE, O. NAKAGOMI, C. D.

- KIRKWOOD, T. K. FISCHER, U. D. PARASHAR, J. S. BRESEE, B. JIANG, AND R. I. GLASS. Serotype diversity and reassortment between human and animal rotavirus strains: implications for rotavirus vaccine programs. **J. Infect. Dis.**, 192(Suppl. 1):S146–S159, 2005.
- GHOSH, S.; VARGHESE, V.; SAMAJDAR, S.; BHATTACHARYA, S.K.; KOBAYASHI, N.; NAIK, T.V. (2007) Evidence for independence segregation of the VP6- and NSP4-encoding genes in porcine group A rotavirus G6P[13] strains. *Arch Virol*, 152: 423-429.
- GILIO, A. E.; BALDACCI, E. R.; OKAY, Y. Introdução ao estudo do rotavírus. **Revisões e Ensaio**s, p. 49-54, 1991.
- GOMBOLD, J. L.; RAMIG, R. F. Genetics of rotaviruses. In: Ramig, R. F. (Org.). **Rotaviruses**. Houston, 1994, p. 129-179.
- GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: a geographical tool for sequence finishing. **Genome Research**, Woodbury, v. 8, p. 195-202, 1998.
- GOUVEA, V.; CASTRO, L.; TIMENETSKY, M. C.; GREENBERG, H.; SANTOS, N. Rotavirus serotype G5 associated with diarrhea in Brazilian children. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 5, p. 1408-1409, 1994.
- GOUVEA, V., GLASS, R. WOODS, P., TANIGUCHI, K., CLARCK, H.F., FORRESTER, B., FANG, Z.Y. (1990) Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 28 (2): 276-282.
- GREEN, K. SEARS, Y.; TANIGUCHI, F.; MIDTHUN, K.; HOSHINO, K.; GORZILIA, Y.; NISHIKAWA, M.; URASAWA, K.; KAPIKIAN, S.; CHANOCK, Z.; FLORES, M. Prediction of human rotavirus serotype by nucleotide sequences analysis of the VP7 protein gene. **Journal Virology**, v. 62, p. 1819-1823, 1988.
- GULATI, B. R.; DEEPA, R.; SINGH, B. K.; DURGA-RAO, C. 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. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 3, p. 972–978, 2007.
- GULATI, B. R.; NAKAGOMI, O.; KOSHIMURA, Y.; NAKAGOMI, T.; PANDEY, R. Relative frequencies of G and P types among rotaviruses from Indian diarrheic

- cow and buffalo calves. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 6 p. 2074-2076, 1999.
- HALL, T. **BioEdit** – version 5.0.6. Raleigh: North Carolina State University, Department of Microbiology, 2001. 192 p.
- HOUSE, J. A. Economic impact of rotavirus and other neonatal disease agents of animals. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 173, p. 573-576, 1978.
- KAMINJOLO, J. S.; ADESIYUN, A. A. Rotavirus infection in calves, piglets, lambs and goat kids in Trinidad. **British Veterinary Journal**, v. 150, p. 293-299, 1994.
- KAPIKIAN, A. Z.; HOSHINO, Y; CHANOCK, R. M. Rotaviruses. In: Bernard, N. F.; David, M. K.; Peter, M. H. (Org.). **Fields Virology**. 3. ed. Philadelphia, 2001. p. 1657-1708.
- 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. **Journal of Medical Virology**, v. 78, p. 986–994, 2006.
- KIM, Y.; CHANG, K. O.; STRAW, B.; SAIF, L. J. Characterization of group C rotaviruses associated with diarrhea outbreaks in feeder pigs. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 5, p. 1484-1488, 1999.
- KLINGENBERG, K. V.; NILSSON, M.; SVENSSON, L. Rotavirus G-Type restriction, persistence, and herd type specificity in swedish cattle herds. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 6, n. 2, p. 181-185, 1999.
- KOOL, D. A.; MATSUI, S. M.; GREENBERG, H. B.; HOLMES, I. H. Isolation and characterization of a novel reassortant between avian Ty-1 and simian RRV rotaviruses. **Journal of Virology**, v. 66, n. 11, p. 6836-6839, 1992.
- LEWIS, G. D.; METCLAF, T. G. Polyethylene glycol precipitation for recovery of pathogenic viruses, including hepatitis A virus and human rotavirus, from oysters, water and sediment samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, p. 1983-1988, 1988.

- LINHARES, A. C. Epidemiologia das infecções por rotavírus no Brasil e os desafios para o seu controle. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 16, n. 3, p. 629-646, 2000.
- MANEEKARN, N.; KHAMRIN, P.; CHAN-IT, W.; PEERAKOME, S.; SUKCHAI, S.; PRINGPRAO, K.; USHIJIMA, H.; Detection of rare G3P[19] porcine rotavirus strains in Chiang Mai, Thailand, provides evidence for origin of the VP4 genes of Mc323 and Mc345 human rotaviruses. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 11, p. 4113–4119, 2006.
- 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** 41:5665–5675, 2003.
- 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. Relationships among porcine and human P(6) rotaviruses: evidence that the different human P(6) lineages have originated from multiple interspecies transmission events. **Virology**, v. 344, p. 509-519, 2006.
- MARTELLA, V.; PRATELLI, A.; GRECO, G.; TEMPESTA, M.; FERRARI, M.; LOSIO, M. N.; BUONAVOGLIA, C. Genomic characterization of porcine in Italy. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 8, n. 1, p. 129-132, 2001.
- MARTELLA, V., CIARLET, M., BASELGA, R., ARISTA, S., ELIA, G., LORUSSO, E., BANYAI, K., TERIO, V., MADIO, A., RUGGERI, F.M., FALCONE, E., CAMERO, M., DECARO, N., BUONAVOGLIA, C., 2005. Sequence analysis of the VP7 and VP4 genes identifies a novel VP7 gene allele of porcine rotaviruses, sharing a common evolutionary origin with human G2 rotaviruses. **Virology**, 337: 111– 123.
- MARTIN-LATIL, S.; MOUSSON, L.; AUTRET, A.; COLBÈRE-GARAPIN, F.; BLONDEL, B. Bax is activated during rotavirus-induced apoptosis through the mitochondrial pathway. **Journal of Virology**, v. 81, n. 9, p. 4457-4464, 2007.
- MASCARENHAS, J. D. A. Caracterização dos eletroferotipos, sorotipos e genótipos de rotavírus provenientes de crianças participantes de um estudo com a vacina tetravalente anti-rotavírus (TV-RRV) em Belém, Pará. Dissertação de Mestrado. Rio de Janeiro – RJ, Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz, 1999.



- MATTION N. M.; MITTCHELL D. B.; BOTH, G. W.; ESTES, M.; K. Expression of rotavirus proteins encoded by alternative open reading frames of genome segment 11. **Virology**, v. 181, p. 295-304, 1991.
- MENEGHETTI, A. C.; BOLOGNINI, A. M; LAURETTI, F.; LINHARES, R. E. C.; SANTOS, N.; NOZAWA, C. M. Incidence of group A rotavirus in urban and rural areas of the city of Londrina-Brazil, from 1995 to 1997. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, vol. 44, n. 3, p. 257-261, 2001.
- MERIAL Brasil. **Soluções em vacinas**. Disponível em: <<http://www.merial.com.br>>. Acesso em 22 jan. 2008.
- MIDDLETON, P. J. Viruses that multiply in the gut and cause endemic and epidemic gastroenteritis. **Clinical and Diagnostic Virology**, v. 6, p. 93-101, 1996.
- MIRAZIMI, A.; MAGNUSSON, K.; SVENSSON, L. A cytoplasmic region of the NSP4 enterotoxin of rotavirus is involved in retention in the endoplasmic reticulum. **Journal of General Virology**, v. 84, p. 875-883, 2003.
- MUNFORD, V.; SOUZA, E. C.; CARUZO, T. A. R.; MARTINEZ, M. B.; RÁCZ, M. L. Serological and molecular diversity of human rotavirus in São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 459-466, 2007.
- MURPHY, F. A.; GIBBS, E. P. J.; HORZINEK, M. C.; STUDDERT, M. J. Veterinary virology. **Academic Press**. 3 ed. California, p. 402-404, 1995.
- NAKAGOMI, O.; NAKAGOMI, T. Interspecies transmission of rotavirus studied from the perspective of genogroup. **Microbiology Immunology**, v.37, p. 337-348, 1993.
- NAKAGOMI, T.; NAKAGOMI, O. Human rotavirus HCR3 possesses a genomic RNA constellation indistinguishable from that of feline and canine rotaviruses. **Arch. Virol.**, 145:2403-2409, 2000.
- NETO, U.F. Infecção por rotavírus. In: Tonelli, E. (Org.). **Doenças Infecciosas na Infância**. MEDSI, 1987. p. 621-625.
- OFFIT, P. A. Immunologic determinants of protection against rotavirus disease. In: RAMIG, R. F. (Org.). **Rotaviruses. Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 185, 1994, p. 230-253.

- OFFIT, P.A. (1994) Immunologic determinants of protection against rotavirus disease. In: Rotaviruses. Ramig, R.F. (Ed.). *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 185: 230-253.
- ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. **Vigilancia epidemiológica de diarreas causadas por rotavirus: guía práctica**. Washington, 2007, Publicación Científica y Técnica n. 623.
- OSPINO, D. U. Diversidad genética del rotavirus: su implicación en la prevención y control de la diarrea. **Asociación Colombiana de Infectología**, v. 8, n. 4, p. 293-300, 2004.
- PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, FAMILY AND COMMUNITY HEALTH AREA, IMMUNIZATION UNIT, 2003. Washington. **Regional meeting on the implementation of rotavirus epidemiological surveillance: generating information for decision-making**. Washington, 2003, p.66-70.
- PARASHAR, U. D.; GIBSON, C. J.; BRESEE, J. S.; GLASS, R. I. Rotavirus and severe childhood diarrhea. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 2, p. 304-306, 2006.
- PARK, S.; SAIF, L. J.; JEONG, C.; LIM, G.; PARK, S.; KIM, H.; PARK, S.; KIM, Y.; JEONG, J.; KANG, M.; CHO, K. Molecular characterization of novel G5 bovine rotavirus strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 11, p. 4101-4112, 2006.
- PEER, V.D.Y., WACHTER, D.R. TREECON: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees. *Comput. Applic. Biosci.* 9, 177–182, 1993.
- PESAVENTO, J. B.; ESTES, M. K.; PRASAD, B. V. V. Structural organization of the genome in rotavirus. In: DESSELBERGER, U.; GRAY, J. (Org.). **Viral Gastroenteritis**. 1 ed. Amsterdam: Elsevier Science, 2003. v. 9, p.115-128.
- PORTELLA, C. V.; Los rotavirus. In: \_\_\_\_\_ (Tese de Doutorado). *Vigilância Molecular Ambiental de rotavirus grupo A humanos*. Barcelona, 1999. cap. 1.
- PRASAD, B. V. V.; CHIU, W. Structure of rotaviruses. In: RAMIG, R. F. (Org.). **Rotaviruses. Current Topics in Microbiology and Immunology**, 1994, v. 185, p. 9-29.

- RÁCZ, M.L.; KROEFF, S.S.; MUNFORD, V.; CARUZO, T.A.R.; DURIGON, E.L.; HAYASHI, Y.; GOUVEA, V.; PALOMBO, E. (2000) Molecular characterization of porcine from the Southern Region of Brazil: characterization of an atypical genotype G[9] strain. *Journal of clinical microbiology*, 38(6):2443-2446.
- RAHMAN, M.; MATTHIJNSSENS, J.; NAHAR, S.; PODDER, G.; SACK, D. A.; AZIM, T.; RANST, M. V. Characterization of a novel P[25],G11 human group A rotavirus. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 7, p. 3208–3212, 2005.
- RAMIG, R. F. Introduction and overview. In: RAMIG, R. F. (Org.). **Rotaviruses**, Houston, 1994. p. 1-9.
- RAMIG, R. F. Pathogenesis of Intestinal and systemic rotavirus infection. **Journal of Virology**, v. 78, n. 19, p. 10213-10220, 2004.
- RAMOS, A. P. D.; STEFANELLI, C. C.; LINHARES, R. E. C.; BRITO, B. G.; SANTOS, N.; GOUVEA, V.; LIMA, R. C.; NOZAWA, C. The stability of porcine rotavirus in feces. **Veterinary Microbiology**, v. 71, p. 1-8, 2000.
- RHEINGANS, R. D.; CONSTENLA, D.; ANTIL, L.; INNIS, B. L.; BREUER, T. Economic and health burden of rotavirus gastroenteritis for the 2003 birth cohort in eight Latin American and Caribbean countries. **Pan Am J Public Health**, v. 21, n. 4, p. 192-204, 2007.
- ROMERO, C. C.; NORIEGA, L. P. Association of rotavirus viroplasm with microtubules through NSP2 and NSP5. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 6, p. 603-611, 2006.
- ROSEN, B. I.; PARWANI, A. V.; LOPEZ, S.; FLORES, J.; SAIF, L. J. Serotypic differentiation of rotaviruses in field samples from diarrheic pigs by using nucleic acids probes specific for porcine VP4 and human and porcine VP7 genes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n 2, p. 311-317, 1994.
- SAITOU, N.; NEI, M. The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 4, p. 406-425, 1987
- SANTOS, N.; HOSHINO, Y. Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implication of an effective rotavirus vaccine. **Reviews in Medical Virology**, v. 15, p. 29-56, 2005.

- SANTOS, N.; LIMA, R. C. C.; NOZAWA, C. M.; LINHARES, R. E.; GOUVEA, V. Detection of porcine rotavirus type G9 of a mixture of types G1 and G5 associated with Wa-like VP4 specificity: Evidence for natural human-porcine genetic reassortment. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 8, p. 2734-2736, 1999.
- SANTOS, N.; LIMA, R. C. C.; PEREIRA, C. F. A.; GOUVEA, V. Detecção de rotavírus atípicos em criança com diarreia no Rio de Janeiro. **NewsLab**, v. 32, p. 78-86, 1998.
- SANTOS, N.; VOLOTÃO, E. M.; SOARES, C. C.; ALBUQUERQUE, M. C. M.; SILVA, F. M.; CARVALHO, T. R. B.; PEREIRA, C. F. A.; CHIZIKOV, B.; HOSHINO, Y. Rotavirus strains bearing genotype G9 or P[9] recovered from Brazilian children with diarrhea from 1997 to 1999. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 3, p. 1157-1160, 2001.
- SILVA, C.A., BRITO, B.G., MORES, N., AMARAL, A.L. (1999) Ecopatologia da diarreia pós-desmame em granjas de suínos da região Norte do Paraná, Brasil. *Ciência Rural*, Santa Maria, 29,(1): 39-43.
- SILVA, M. L. R.; NAVECA, F. G.; CARVALHO, I. P. Epidemiological aspects of rotavirus infections in Minas Gerais, Brazil. **The Brazilian Journal of Infections Diseases**, v. 5, n. 4, p. 215-222, 2001.
- SILVA, R.R.; BARROS, D.M.; SOUZA, R.K.A.; MOREIRA, A.H.; FIGUEIREDO, H.F. (2001a) Pesquisa de rotavírus em bezerros bovinos no município de Igarapé-Açu (Pa). *Rev. Cienc. Agrár.*, 36:121-129.
- SILVESTRI, L. S.; TARAPOREWALA, Z. F.; PATTON, J. T. Rotavirus replication: Plus-Sense templates for double-stranded RNA synthesis are made in viroplasm. **Journal of Virology**, v. 78, n. 14, p. 7763-7774, 2004.
- TEODOROFF, T. A.; TSUNEMITSU, H.; OKAMOTO, K.; KATSUDA, K.; KOHMOTO, M.; KAWASHIMA, K.; NAKAGOMI, T.; NAKAGOMI, O. Predominance of porcine rotavirus G9 in Japanese piglets with diarrhea: Close relationship of their VP7 genes with those of recent human G9 strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 3, p. 1377-1384, 2005.
- TIMENETSKY, M. C. S. T.; GOUVEA, V.; SANTOS, N.; CARMONA, R. C. C.; HOSHINO, Y. A novel human rotavirus serotype with dual G5-G11 specificity. **Journal of General Virology**, v. 78, p. 1373-1378, 1997.

- THOMPSON J.D., HIGGINS D.G., GIBSON T.J. 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.
- TRASK, S. D.; DORMITZER, P. R. Assembly of highly infectious rotavirus particles recoated with recombinant outer capsid proteins. **Journal of Virology**, v. 80, n. 22, p. 11293-11304, 2006.
- WESTERMAN, L. E.; JIANG, B.; MCCLURE, H. M.; SNIPES-MAGALDI, L. J.; GRIFFIN, D. D.; SHIN, G.; GENTSCH, J. R.; GLASS, R. I.; Isolation and characterization of a new simian rotavirus, YK-1. **Virology Journal**, p. 1-8, 2006.
- WILHELMI, I.; ROMAN, E.; SÁNCHEZ-FAUQUIER, A. Viruses causing gastroenteritis. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 9, n. 4, p. 247-262, 2003.
- WILSON, W.D. Vaccination Programs for Foals and Weanlings **Proceedings of the Annual Convention of the AAEP**, v. 45, p. 254-263, 1999.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2005, Geneva. **External Review of Burden of Disease Attributable to Rotavirus**. Geneva, 2005, p. 1-26.
- WOROBAY, M.; HOLMES, E.C. Evolutionary aspects of recombination in RNA viruses. **Journal of General Virology**, v. 80, p. 2535-2543, 1999.

## **APÊNDICE**

### **ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO**

**ARTIGO N° 1**

## **EPIDEMIOLOGIA DOS GENOTIPOS P (VP4) E G (VP7) DE ROTAVÍRUS SUÍNOS DURANTE 2000-2003.**

G.M. Xavier, C.E.P.F. Travassos, BELICO, P. V. Gouvea  
*Setor de Virologia Veterinária do Laboratório de Sanidade Animal da  
 Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Rio de Janeiro, Brasil*

**RESUMO:** O crescimento da produção interna e da exportação de carne suína depende da sanidade das granjas brasileiras. Leitões com rotavírus podem sobreviver à infecção, mas o número de refugos e os gastos com medicamentos geram prejuízos aos produtores. No período de 2000 a 2003, de 226 amostras de fezes de leitões testadas através de PAGE, quatro foram positivas para rotavírus e caracterizadas através de RT-PCR como G3P[7]; G1-G5P[7]; G5P[7] e G5P[5]. Uma das amostras caracterizou-se por mistura de duas espécies diferentes de rotavírus. Palavras-chave: diarreia, leitões, PAGE, RT-PCR.

## **EPIDEMIOLOGY OF P (VP4) AND G (VP7) GENOTYPES IN PORCINE ROTAVIRUSES ISOLATED DURING 2000-2003.**

**ABSTRACT:** The growth of internal produce and of pork meat exportation depend on the health conditions of Brazilian farm animals. Piglets contaminated by rotavirus could survive but the number of refusals and the costs on veterinary drugs is considered. In the period of 2000 to 2003, of two hundred and twenty-six fecal specimens from piglets were positive to group A rotavirus and characterized by RT-PCR in G3P[7]; G1-G5P[7], G5P[7] and G5P[1]. One of fecal samples presented a case of mixed infection involving two different strains of rotavirus. Key words: diarrhea, piglets, RT-PCR, PAGE.

### **INTRODUÇÃO**

O Brasil ocupa a quarta colocação em exportação de carne suína, sendo superado apenas pelos Estados Unidos, Canadá e União Européia (DESOUZART, 2002). O manejo apropriado em granjas suinícolas pode aumentar o desempenho reprodutivo, reduzir a mortalidade entre os animais (SOBESTIANSKY et al, 1998) e, conseqüentemente, favorecer o crescimento da produção interna e do volume de exportação. Por outro lado, um manejo inadequado pode comprometer o desempenho dos animais, influenciando direta e indiretamente a qualidade da produção. Dentre os fatores

decorrentes de um manejo inadequado cita-se a síndrome diarreica dos leitões (GREGORI et al 2000; DEWEY et al, 2003; BRITO et al, 1999), cuja etiologia é complexa, podendo envolver bactérias, protozoários e vírus (MURPHY et al, 1995; KAPIKIAN et al, 2001).

Os rotavírus têm sido reconhecidos como os principais agentes causadores de gastroenterite aguda em humanos e animais desde a sua primeira descrição por Ruth Bishop, em 1973 (TAGLIARI e BRITO, 1998). Ainda que leitões infectados por rotavírus possam sobreviver, o número de refugos e os gastos com medicamentos aumentam consideravelmente, gerando prejuízos



significativos aos suinocultores (SOBESTIANSKY et al 1998; TAGLIARI e BRITO, 1998).

Diante da importância que as diarreias assumem em relação à produtividade das granjas suínicas, o presente estudo teve por objetivos avaliar a presença de rotavírus através da técnica de eletroforese em gel de poli-acrilamida (PAGE) e caracterizar os genótipos circulantes utilizando a técnica de reação em cadeia de polimerase (RT-PCR).

## MATERIAL E MÉTODOS

### *Obtenção das amostras*

Foram coletadas 226 amostras de fezes entre o período de março de 2001 e janeiro de 2003, a partir de leitões com idade variando de dois a 60 dias (Tabela 1).

**Tabela 1:** Locais de colheita das amostras fecais.

Municípios (Estado)	Número de amostras
Campos (RJ)	16
Itaocara (RJ)	10
Carapebus (RJ)	14
Itaperuna (RJ)	29
Quissamã (RJ)	01
São João da Barra (RJ)	06
Magé (RJ)	06
Rio das Ostras (RJ)	07
Macaé (RJ)	01
São Francisco de Itabapoana (RJ)	01
Amparo do serra (MG)	39
Muriaé (MG)	50
Limeira (MG)	07
Guarapari (ES)	13
Castelo (ES)	19
Cachoeiro de Itapemirim (ES)	03
Venda Nova do Imigrante (ES)	04
Total	226

As amostras de fezes foram coletadas diretamente da ampola retal dos animais, por meio de massagem abdominal ou estímulo com "swabs" e em condições que inviabilizaram estes procedimentos foram coletadas das

superfícies das instalações, desde que recentes.

As fezes foram classificadas de acordo com sua consistência, em líquidas (53 amostras), pastosas (101 amostras) e normais (72 amostras).

Depois de acondicionadas e identificadas em frascos coletores, as amostras foram devidamente encaminhadas ao Setor de Virologia Veterinária do Laboratório de Sanidade Animal da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, onde foram armazenadas em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$ , até o processamento.

### *PAGE*

A presença de rotavírus nas amostras foi detectada pela identificação dos segmentos dsRNA em PAGE. Para tanto, uma suspensão fecal (20%) de cada amostra foi preparada em tampão fosfato salina (PBS) e clarificada por centrifugação a 8.000 g/5min/4 °C.

Uma alíquota de 15  $\mu\text{L}$  foi submetida à PAGE, com concentração final de 7,5%, por aproximadamente 4 horas, a 100 volts e o gel corado com nitrato de prata (HERRING, 1982).

### *RT-PCR*

Os dsRNA virais foram extraídos com TRIzol<sup>®</sup> LS (Invitrogen Corporation, Carlsbad, Califórnia - USA), com modificações a partir da recomendação do fabricante. Foram adicionados aproximadamente 250  $\mu\text{L}$  de fezes em um microtubo (capacidade 1,5 mL) contendo 750  $\mu\text{L}$  de TRIzol<sup>®</sup>. Após homogeneização e incubação à temperatura ambiente durante 15 minutos, foi adicionado 150  $\mu\text{L}$  de clorofórmio (200  $\mu\text{L}$  para cada 1 mL de TRIzol utilizado inicialmente) e em seguida a mistura foi cetrifugada a 12.000 g durante 10 minutos a uma temperatura de 4°C. A fase aquosa obtida foi transferida para um novo

tubo previamente identificado e adicionada de 375 µL de isopropanol (5000 µL para cada 1 mL utilizado inicialmente). Após 10 minutos de incubação à temperatura ambiente, a mistura foi submetida à centrifugação a 12.000 g/10 minutos/4 °C. Ao término desta etapa o sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado uma vez com 1 mL de etanol 75% (v/v) gelado, sendo submetido à homogeneização por vórtex e centrifugação a 7.500 g/5 minutos/4 °C. Novamente descartou-se o sobrenadante e procedeu-se a secagem do sedimento em banho seco (10 minutos/65 °C). Por fim o RNA foi ressuspensão em 25 µL de água ultrapura.

Os pares de iniciadores consensuais Beg9-End9 (GOUVEA et al, 1990) (Tabela 2) e Con3-Con2 (GENTSCH et al, 1992) (Tabela 3) foram utilizados neste estudo para primeira amplificação da RT-PCR.

Cada produto da RT-PCR foi submetido a uma segunda amplificação (Nested-PCR) com os iniciadores Beg9 (para o tipo G) e Con3 (para o tipo P) e um coquetel de iniciadores genotipo-específicos (Tabelas 2 e 3).

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 0,8% e foto-documentados pelo sistema EagleEye.

**Tabela 2:** Iniciadores utilizados para amplificação do fragmento de 1062 pb do gene da VP7 (G) e para tipagem por Nested-PCR (GOUVEA et al, 1990).

Nome	Seqüência (5'-3')	Posição (nt)
Beg9	GGCTTTAAAAGAGAGAATTTCCGTCTGG	1-28
End9	GGTCACATCATACAATTCTAATCTAAG	1062-1036
aAT8	GTCACACCATTGTAAATTCG	178-198
aBT1	CAAGTACTCAAATCAATGATGG	314-335
aCT2	CAATGATATTAACACATTTTCTGTG	411-435
aDT4	CGTTTCTGGTGAGGAGTTG	480-498
aET3	CGTTTGAAGAAGTTGCAACAG	689-709
aFT9	CTAGATGTAACACTACTAC	757-776

**Tabela 3:** Iniciadores utilizados para amplificação do fragmento de 876 pb do gene da VP4 (P) e para tipagem por Nested-PCR (GENTSCH et al, 1992).

Nome	Seqüência (5'-3')	Posição (nt)
Con 3	TGGCTTCGCCATTTTATAGACA	11-32
Con 2	ATTTCCGGACCATTATAAACC	868-887
1T-1	TCTACTTGGATAACGTGC	339-356
2T-1	CTATTGTTAGAGGTTAGAGTC	474-494
3T-1	TGTTGATAGTTGGATTCAA	259-278
4T-1	TGAGACATGCAATTGGAC	385-402
5T-1	ATCATAGTTAGTAGTCGG	575-594

## RESULTADOS

As granjas visitadas caracterizaram-se por apresentar dois padrões tecnológicos distintos: produção rústica (38 granjas) e tecnificada (11 granjas), estas últimas com restrição à entrada de pessoas.

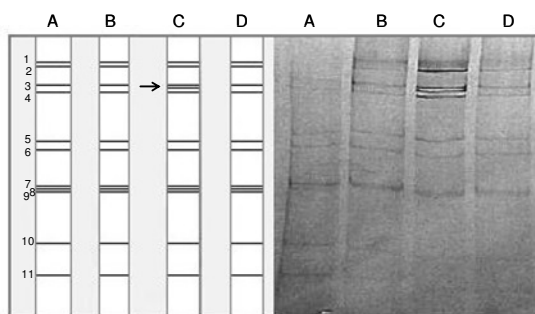
Em 44,8% (22/49) das propriedades foram observados casos de diarreias entre leitões no dia da visita.

Das 226 amostras de fezes de leitões examinadas, quatro (1,77%) foram positivas para rotavírus. Do total de amostras testadas por PAGE, 53 (23,45%) foram classificadas como diarreicas, 101 (44,69%) como pastosas e 72 (31,86%) foram classificadas como normais.

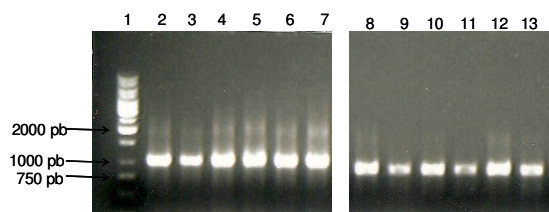
Das amostras positivas para rotavírus (n=4), duas eram diarreicas (204 e 211) e duas eram pastosas (79 e 179) no momento da coleta. Três amostras apresentaram os 11 segmentos de dsRNA, distribuídos de acordo com o padrão 4-2-3-2, característico do grupo A, quando analisadas por PAGE e foram colhidas após períodos de chuvas (jan/2003). A amostra 179 apresentou uma banda extra entre os segmentos 3 e 4 após coloração do gel (Figura 1) e foi a única amostra positiva colhida em jul/2002.

Os genes para VP4 e VP7 foram amplificados em todas as amostras testadas e renderam fragmentos com tamanhos esperados, 876 pb e 1062 pb, respectivamente (Figura 2). A caracterização genotipo-específico

também foi possível em todas as amostras testadas (dados não mostrados) e foram classificadas conforme Tabela 4.



**Figura 1:** Perfil eletroforético de RVs identificados no estudo. À esquerda, diagrama ilustrativo mostrando a migração 4-2-3-2 e o segmento extra (seta) entre os segmentos 3 e 4. A, amostra 79, B, 204, C, 179 e D, 211.



**Figura 2:** RT-PCR (1ª amplificação). A figura da esquerda refere-se à amplificação do gene da VP7 (1062 pb) e a da direita ao gene da VP4 (876 pb). Marcador de 1000 pares de bases (linha 1); amostra 79 (linhas 2, 3, 8 e 9), 204 (4, 5, 10 e 11) e 211 (6, 7, 12 e 13).

**Tabela 4:** Associação entre os genótipos P e G encontrados, consistência das fezes e idade dos animais.

Amostra	Consistência das fezes	Idade dos animais	PCR
79	pastosas	9 dias	P[7]G3
179	pastosas	21 dias	P[7]G1-G5
204	líquidas	9 dias	P[7]G5
211	líquidas	21 dias	P[1]G5

## DISCUSSÃO

Das 38 granjas de produção rústica, 17 não possuíam qualquer tipo de manejo nutricional ou sanitário. A ocorrência de diarreia nestas granjas foi considerada fator de risco que interfere no desempenho dos leitões (SILVA et al, 1999; BRITO et al, 1999), e o índice elevado (44,8%), responsável por baixas performances no ganho de peso, e na taxa de sobrevivência, aumentando o número

de refugos e gastos com medicamentos (SILVA et al, 1999; BRITO et al, 1999).

A presença de rotavírus durante todo o ano já está bem estabelecida em países de clima tropical, com registro de picos ocorrendo durante os meses mais frios e secos do ano (SANDERS, 1985; KAPIKIAN et al, 2001; LINHARES, 2000; SILVA et al, 2001). Entretanto, neste estudo, apesar do pequeno número de amostras positivas, a maior frequência de rotavírus foi registrada no mês de janeiro. Coiro et al (1985) encontraram resultado semelhante, com maior frequência de rotavírus ocorrendo durante o mês de janeiro (78,1%) e a menor durante o mês de setembro (16,7%)

As possíveis razões para o baixo índice de prevalência dos rotavírus entre as amostras analisadas incluem a excreção de vírus em níveis não detectáveis ou em períodos que antecederam ou sucederam à coleta. Entretanto, a baixa positividade também foi registrada entre bezerros (0,5%) (MARTELLA et al, 2001), ovelhas (2,1%) (GHOSH et al, 2007) e cães (3%) (GABBAY et al, 2003).

A faixa etária dos animais, a consistência das fezes e sua correlação com a positividade nos ensaios (Tabela 4) corroboram com os estudos que demonstram que a rotavirose é mais prevalente entre animais jovens e com diarreia (KAPIKIAN et al, 2001; SILVA et al, 2001; MUÑOZ et al 1996). Entretanto, como animais muito jovens geralmente eliminam fezes de consistência pastosa, que podem ser consideradas normais, é importante que a coleta não seja restrita a fezes líquidas (SILVA et al, 2001).

Os rotavírus têm sido identificados em suínos com frequência que varia de 8% (RÁCZ et al, 2000) a 35% (SILVA

et al, 2001) e os principais tipos G e P encontrados referem-se a G3, G4, G5, G11 e P[6] e P[7] (ESTES, 2001).

A amostra caracterizada como G1-G5 foi a mesma que apresentou uma banda extra de dsRNA revelada através do PAGE (Figura 1). A mistura G1-G5 foi também observada em estudo desenvolvido no Brasil, onde de 10 amostras analisadas, uma demonstrou o caso de infecção mista em suínos, entretanto, no referido estudo não foi possível relacionar o surgimento de banda extra a um padrão eletroforético diferente de 4-2-3-2 observado no grupo A de rotavírus (GABBAY et al, 2003). Neste estudo, contudo, foi possível correlacionar a mistura G1-G5 detectada por RT-PCR a um padrão de migração 5-2-3-2.

A presença de um ou mais segmentos adicionais nos eletroferogramas pode indicar que um mesmo animal tenha sido infectado com dois ou mais tipos de rotavírus e que a progênie resultante apresente um perfil diferente das cepas que lhe deram origem. Isto demonstra a diversidade genética que os rotavírus apresentam e indica como os vírus evoluem através da recombinação entre seus segmentos genéticos.

As combinações P[7]G3, P[7]G5, P[7]G1-G5 e P[1]G5 encontradas correspondem àquelas observadas em outros estudos (RÁCZ et al, 2000; SILVA et al, 2001; GHOSH et al, 2007; GABBAY et al, 2003).

## CONCLUSÕES

A interpretação deste estudo foi limitada pelo baixo número de amostras analisadas e pelo fato destas amostras terem sido coletadas em regiões restritas dos estados do Rio de Janeiro, Minas Gerais e Espírito Santo (Tabela 1). Entretanto, estes achados demonstram a circulação de rotavírus em granjas de distintos padrões

tecnológicos e reforçam a importância do monitoramento destes vírus entre as unidades de produção animal.

Este estudo pretende contribuir para o conhecimento dos genótipos circulantes nas regiões estudadas e fornecer subsídios para novos estudos que objetivem a vigilância e caracterização molecular dos RVs.

## REFERÊNCIAS

BRITO, B.G., MORES, N., AMARAL, A.L., TAGLIARI, K.C. (1999) Fatores de risco no desencadeamento de diarreias pré-desmame em granjas suínolas do Sudeste do Paraná. *Pesquisa Agropecuária Gaúcha*, 5 (1): 127-132.

COIRO, J.R.; NETO, A.J.A.; HEUSER, M.C.; BENDATI, M.; VASCONCELLOS, V.L. (1985) Acute enteritis associated with rotavirus presence in Brazilian children: evaluations on prevalence, therapy and age group. *Journal of Diarrhoeal Disease Research*, 3(2): 78-83.

DESOUZART, O. (2002) Maiores exportadores mundiais de carne suína. <http://www.porkworld.com.br> em 07/02/2003.

DEWEY, C.; CARMAN, S.; PASMA, T.; JOSEPHSON, G.; MCEWEN, B. (2003) Relationship between group A porcine rotavirus and management practices in swine herds in Ontario. *Can Vet J*, 44:649-653.

ESTES, M. (2001) Rotaviruses and their replication. In: Bernard, N.F., David, M.K., Peter, M.H. (eds.), *Fields Virology*. 3. ed., Philadelphia.

GABBAY, Y.B.; HOMEM, V.S.F.; MUNFORD, V.; ALVES, A.S.; MASCARENHAS, J.D.P.; LINHARES, A.C.; RÁCZ, M.L. (2003) Detection of rotavirus in dogs with diarrhea in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 34:77-80.

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. *Journal of Clinical Microbiology*, 30 (6): 1365-1373.
- GHOSH, S.; VARGHESE, V.; SAMAJDAR, S.; BHATTACHARYA, S.K.; KOBAYASHI, N.; NAIK, T.V. (2007) Evidence for independence segregation of the VP6- and NSP4-encoding genes in porcine group A rotavirus G6P[13] strains. *Arch Virol*, 152: 423-429.
- GOUVEA, V, GLASS, R. WOODS, P., TANIGUCHI, K., CLARCK, H.F., FORRESTER, B., FANG, Z.Y. (1990) Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 28 (2): 276-282.
- GREGORI, F., BRANDÃO, P.E., ROSALES, C.A.R. , CORTEZ, A., HEINEMANN, M.B., RICHTZENHAIN, L.J., JEREZ, J.A. (2000) Desenvolvimento de um método de ELISA para a detecção de rotavírus a partir de material fecal. *Arquivos do Instituto Biológico*, 67 (2): 191-194.
- HERRING, A.J.J.D. (1982) Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrilamide gels. *Journal of Clinical Microbiology*, 16: 473-477.
- KAPIKIAN, A.Z., CHANOCK, R.M. (2001) Rotaviruses. In: Bernard, N.F., David, M.K., Peter, M.H. (eds.), *Fields Virology*. 3. ed., Philadelphia.
- LINHARES, A. C. Epidemiologia das infecções por rotavírus no Brasil e os desafios para o seu controle. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 16, n. 3, p. 629-646, 2000.
- MARTELLA, V.; PRATELLI, A.; GRECO, G.; TEMPESTA, M.; FERRARI, M.; LOSIO, M.N.; BUONAVOGLIA, C. (2001). Genomic characterization of porcine in Italy. *Clin and Diagn Lab Immunol*, 8(1): 129-132.
- MUÑOZ, M.; ALVAREZ, M.; LANZA, I.; CÁRMENES, P. (1996) Role of enteric pathogens in the aetiology of neonatal diarrhoea in lambs and goats kids in Spain. *Epidemiol. Infect.*, 117: 203-211.
- MURPHY, F.A., GIBBS, E.P.J., HORZINEK, M.C., STUDDERT, M.J. (1995) *Veterinary Virology*, 3 ed Academic Press, California, p. 402-404.
- RÁCZ, M.L.; KROEFF, S.S.; MUNFORD, V.; CARUZO, T.A.R.; DURIGON, E.L.; HAYASHI, Y.; GOUVEA, V.; PALOMBO, E. (2000) Molecular characterization of porcine from the Southern Region of Brazil: characterization of an atypical genotype G[9] strain. *Journal of clinical microbiology*, 38(6):2443-2446.
- SANDERS, R.C. (1985) Molecular epidemiology of human rotavirus infections. *European Journal of Epidemiology*, 1, (1): 19-32.
- SILVA, C.A., BRITO, B.G., MORES, N., AMARAL, A.L. (1999) Ecopatologia da diarréia pós-desmame em granjas de suínos da região Norte do Paraná, Brasil. *Ciência Rural*, Santa Maria, 29,(1): 39-43.
- SILVA, R.R.; BARROS, D.M.; SOUZA, R.K.A.; MOREIRA, A.H.; FIGUEIREDO, H.F. (2001) Pesquisa de rotavírus em bezerros bovinos no município de Igarapé-Açu (Pa). *Rev. Cienc. Agrár.*, 36:121-129.
- SOBESTIANSKY, J., WENTZ, I., SILVEIRA, P.R.S., SESTI, L.A.C. (1998) *Suínocultura intensiva: produção, manejo e saúde do rebanho*. Brasília: EMBRAPA-SPI, 388p.
- TAGLIARI, K.C., BRITO, B.G. (1998) Redução do ganho de peso e ocorrência de mortalidade por diarréia em leitões lactentes. *Pesquisa Agropecuária Gaúcha*, 4,(2): 211-213.

**ARTIGO N° 2**

## CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS GENES CODIFICADORES DE VP4 E VP7 DE ROTAVÍRUS DE SUÍNOS E HUMANOS

G.M. Xavier<sup>1</sup>, V.C.L. Marques<sup>2</sup>; G.A.S. Filho<sup>2</sup>, Souza, A.N.<sup>2</sup>, C.E.P.F. Travassos<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Laboratório de Sanidade Animal, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Rio de Janeiro, Brasil*

<sup>2</sup>*Núcleo de Análise Genômica, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Rio de Janeiro, Brasil*

**Resumo:** Os rotavírus são os principais vírus associados à gastroenterite em humanos e animais, e geram prejuízos econômicos e sociais tanto em países desenvolvidos como em países em desenvolvimento. Este estudo objetivou analisar as seqüências de nucleotídeos dos genes codificadores de VP4 e VP7 de amostras fecais de suínos e de humanos. Os resultados indicam que os rotavírus isolados pertencem ao genótipo G9 (amostra 79), G5 (amostra 204) e G1 (amostra Hum-1) e compartilham alta similaridade entre amostras de suínos e de humanos, comprovando a diversidade genética característica dos RVs.

Palavras-chave: rotavírus, VP7, tipo G

## MOLECULAR CHARACTERIZATION OF ENCODING GENES OF VP4 AND VP7 FROM PORCINE AND HUMAN ROTAVIRUS

**Abstract:** Rotaviruses are the most viruses associated to gastroenteritis in humans and animals, causing economic and social burden both in developed countries and in developing countries. The present study aimed to characterize the VP4 and VP7 encoding genes of porcine and human samples. The results indicate that isolates rotavirus belongs to genotype G9 (sample 79), G5 (sample 204) and G1 (sample Hum-1) and share high similarity between samples of pigs and humans, proving the genetic diversity characteristic of the RVs.

Key words: rotavirus, VP7, G-type

### INTRODUÇÃO

A gastroenterite causada por rotavírus (RVs) é uma das principais causas de morbi-mortalidade observada em humanos de todo o mundo. Entre as espécies animais também se observa índices elevados de diarreia, principalmente entre indivíduos neonatos. A morbidade observada acarreta perda de peso dos animais, custo elevado com tratamentos, além de um risco real para saúde pública, uma vez que a transmissão interespecie é considerada possível (MENEGETTI et al, 2001; KHAMRIN et al, 2006;

MARTELLA et al, 2006; FUKAI et al, 2007).

A partir da reunião regional sobre a implantação da vigilância epidemiológica de rotavírus, que ocorreu no Peru em 2003, a Organização Pan-Americana de Saúde (PAHO) elaborou uma série de recomendações, entre elas algumas de caráter geral envolvendo os estudos epidemiológicos dos RVs e um banco de dados sobre sua vigilância. Uma vez que a diversidade genômica dos RVs é reconhecidamente um importante fator na ocorrência das diarreias, torna-se imprescindível uma vigilância

epidemiológica das cepas circulantes, antes e após a implementação de programas de imunização, semelhante à empregada para o monitoramento do vírus influenza e conforme preconizado pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 2005).

Com o objetivo de contribuir para o programa de vigilância epidemiológica molecular, o presente trabalho descreve a caracterização molecular de RVs obtidos a partir de amostras diarréicas de suínos e de crianças menores de cinco anos de idade.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Extração de dsRNA e RT-PCR:** Os dsRNA virais de quatro amostras de fezes provenientes de suínos e duas de humanos foram extraídos com TRIzol<sup>®</sup> LS (Invitrogen Corporation, Carlsbad, Califórnia - USA), de acordo com a recomendação do fabricante. Os dsRNAs extraídos foram utilizados como molde para obtenção de cDNA, e estes utilizados para a transcrição reversa (RT) (GOUVEA et al, 1990; GENTSCH et al, 1992) A síntese de cDNA foi conduzida em termociclador a uma temperatura de 42 °C durante 50 minutos. O cDNA obtido pela RT foi utilizado para amplificação dos segmentos de 876 pb (VP4) e 1062 pb (VP7) , segundo descrito por Gentsch et al (1992) e Gouvea et al (1990), respectivamente., A amplificação foi conduzida em termociclador com a programação de uma desnaturação inicial a 94 °C durante 2 minutos; seguida por 40 ciclos de desnaturação (90 °C/30s), anelamento (42 °C/60s) e extensão (70 °C/90s); e por uma extensão final a 70 °C durante 7 minutos. Os produtos da amplificação foram visualizados em gel agarose 0,8% com brometo de etila e foto-registrados pelo sistema computacional Eagle-Eye.

**Seqüenciamento:** Os amplicons provenientes da RT-PCR foram precipitados com propilenoglicol (PEG), conforme preconizado por Lewis e Metcalf (1988), com modificações. Resumidamente, uma alíquota de 18 µL de cada amplicon obtido pela RT-PCR foi adicionada a um microtubo contendo 8µL de NaCl 5M, 14 µL de água ultrapura autoclavada e 40 µL de PEG 8000 (Sigma). A mistura foi incubada a 4 °C por um período mínimo de 4 horas e em seguida centrifugada a 10.000 g/4 °C/15 min, sendo o sobrenadante descartado ao final do procedimento. Um volume de 500 µL de etanol 70% gelado foi adicionado ao sedimento e o conjunto centrifugado a 10.000 g/4 °C/5 min. O sobrenadante foi novamente descartado e o sedimento submetido à secagem a 65 °C em banho seco. Por fim o DNA peletizado foi ressuspense em 10 µL de água ultrapura autoclavada.

A seqüência de nucleotídeos dos genes que codificam VP4 e VP7 de RVs foi determinada utilizando-se o kit "Dyamic ET Terminator Cycle Sequencing" (Applied Biosystems), conforme instruções dos fabricantes.

A reação de seqüenciamento foi conduzida em termociclador com a programação de uma desnaturação inicial a 96 °C/60 s e 25 ciclos, cada um composto por desnaturação a 96 °C/20 s, anelamento a 42 °C/5 s e extensão a 60 °C/4 min.

Após o término da reação de seqüenciamento, as amostras foram purificadas de acordo com protocolo fornecido pelo fabricante do kit de seqüenciamento (Applied Biosystems) e aplicadas no seqüenciador ABI-Prism 377 DNA (Perkin Elmer, Applied Biosystems Instruments).

**Análise das seqüências:** Foram utilizados os recursos computacionais Bioedit Sequence Alignment Editor versão 7.0.9.0 (HALL, 2001), Treecon



versão 1.3b (PEER, 2001), além das ferramentas disponibilizadas pelo Centro Nacional de Informação Biotecnológica (National Center of Biotechnology Information's - NCBI's) e Laboratório de Biologia Molecular Europeu (European Molecular Biology

Laboratory's - EMBL's), via rede mundial de computadores.

Para análise comparativa foram utilizadas seqüências de RVs humano e suíno classificados com G3 e G9 (Tabela 1) e seqüência de RVs abrangendo os 15 tipos G descritos até o momento (Tabela 2).

**Tabela 1:** Cepas de RVs classificados como G3 e como G9 de origem suína e humana utilizadas neste estudo.

Acesso no GenBank	Cepa isolada	Origem	Tipo G	Acesso no GenBank	Cepa isolada	Origem	Tipo G
DQ873678	Y111	Humana	3	EU348715	P50	Suína	3
DQ873679	L226	Humana		AB176680	JP16-3	Suína	9
EF088832	5290	Humana		AB176679	JP13-3	Suína	
EF495127	RUS79	Humana		AB176683	JP35-7	Suína	
AY707788	CMP039	Suína		AB176682	JP32-4	Suína	
L35079	A138	Suína		AB176681	JP29-6	Suína	
L35060	A411	Suína		AB176678	JP3-6	Suína	
L35059	A34	Suína		AB180969	WI-61	Bovina	
L35058	C134	Suína		L14072	116E	Humana	
L35057	-	Suína		AB180972	O-1	Suína	
L35056	CC117	Suína		AB176677	HOKKAIDO-14	Suína	
L35054	A46	Suína		M63266	NCDV	Bovina	6
NC_007468	B4106	Humana					

**Tabela 2:** Cepas de RVs utilizadas neste estudo. Hu=humana, Su=suína, Eq=eqüina, Bo=bovina, Lh=Lhama (camelídeo), Av=ave (peru e galinha). OSU corresponde ao protótipo suíno do grupo G5.

Acesso no GenBank	Origem/tipo G	Acesso no GenBank	Origem/tipo G	Acesso no GenBank	Origem/tipo G	Acesso no GenBank	Origem/tipo G
D16328	Hu1/G1	AF039524	Lh/G8	EF059917	Hu1/G12	EU284736	Hu1/G12
EF199723	Hu/G2	AB176683	Su1/G9	L24164	Su/G1	DQ204743	Su/G12
NC_007468	Hu/G3	AB176682	Su2/G9	DQ534015	Su/G2	AY750923	Eq1/G14
EU139427	Hu/G4	AB176681	Su3/G9	DQ786577	Su/G3	DQ981479	Su/G16
AB257126	Hu/G5	AB176680	Su4/G9	DQ683521	Su/G4	D25229	Eq2/G14
AF421183	Hu/G6	AB176679	Su5/G9	DQ515961	Su/G5	L49042	Eq3/G14
AB272753	Hu1/G8	AB176678	Su6/G9	X04613	OSU/G5	AB046468	Eq4/G14
AY855064	Hu2/G8	AB176677	Su7/G9	AF242393	Eq/G5	U05348	Eq5/G14
AB180969	Hu1/G9	AB176672	Su8/G9	M63266	Bo/G6	U05349	Eq6/G14
L14072	Hu2/G9	AY707787	Su9/G9	S58166	Av2/G7	AB046467	Eq7/G14
AY843333	Hu/G10	U35850	Su/G10	X56784	Av3/G7	M61876	Eq8/G14
AB264007	Hu/G11	L24163	Su/G11	DQ13549	Eq/G13	AF237666	Bo/G15

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre as amostras analisadas, somente aquelas identificadas como 79G, 204G e Hum-1 foram eficientemente seqüenciadas para o produto de amplificação do gene que codifica VP7.

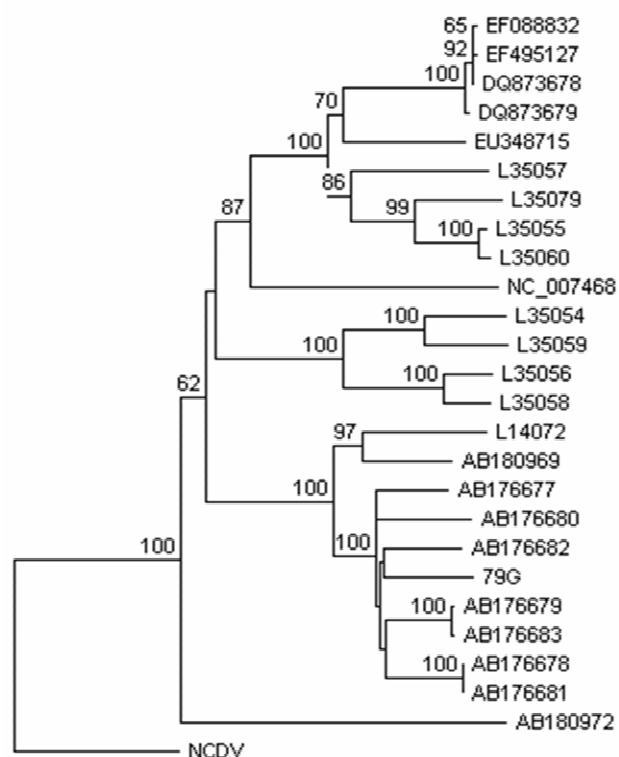
A amostra 79G foi agrupada junto com as demais cepas de RVs de origem suína e classificada como G9 (Figura 1), ainda que tenha sido caracterizada por RT-PCR como G3. Este resultado sugere que esta amostra apresenta mutações que possam interferir na caracterização por RT-PCR. Entretanto, uma melhor avaliação é necessária para confirmar esta hipótese.

O nível de homologia entre a amostra 79G e as demais foi maior entre cepas de origem suína e provenientes do Japão. Santos et al (2001) encontraram resultado semelhante ao analisarem 157 amostras positivas de RVs provenientes de crianças menores de cinco anos de idade, internadas ou atendidas em ambulatórios do estado do Rio de Janeiro, durante 1997 e 1999. No referido estudo, entretanto, os autores observaram elevada similaridade genética entre cepas de procedência brasileira e classificadas como G3P[9] e o vírus AU-1 de procedência japonesa, que por sua vez é geneticamente similar aos RVs felinos, o que sugere uma infecção zoonótica envolvendo cepas humana e felina. Infelizmente, no presente estudo não foi possível correlacionar a ocorrência do genotipo G9 com a presença de felinos na propriedade onde a amostra 79G foi coletada. Entretanto, levando-se em consideração os mecanismos evolutivos que favorecem a

diversidade de RVs, é possível que tal similaridade observada seja resultado de recombinação genética interespecie com ou sem a participação de felinos como hospedeiros intermediários.

A similaridade entre cepas de procedência brasileira e asiática também foi observada em estudo conduzido por Wang et al (2007), que avaliaram os genotipos de maior ocorrência em adultos e crianças com diarreia, entre os anos de 2001 e 2006. No referido estudo as cepas G9 agruparam-se com outros tipos G9 dos Estados Unidos, Brasil, Índia, Bangladesh, Tailândia, Austrália, Itália e alguns países da África, compartilhando níveis de homologia entre 97-99%.

As amostras 204G e Hum-1, ambas classificadas por RT-PCR como G5 foram comparadas às cepas de RVs de diferentes tipos G (Figura 2).



**Figura 1:** Dendograma para a amostra 79, obtida pelo método do vizinho mais próximo (neighbour-joining), de acordo com a seqüência de nucleotídeos de RVs G3 e G9, de origem suína e humana. A cepa NCDV (G6) foi utilizada como raiz para grupo externo. Os valores de bootstrap (%) são mostrados. As cepas estão referenciadas na Tabela 1.

De acordo com a Figura 2, a amostra 204G foi agrupada junto com outras cepas de RVs G5, mostrando elevada homologia (94%) com a cepa eqüina (H-1) (dados não mostrados). Esta cepa eqüina representa um exemplo de possível transmissão interespecífica de suínos para eqüinos, conforme observado em estudos conduzidos por Ciarlet et al (2001), onde foram analisadas as seqüências dos genes codificadores das proteínas estruturais VP4, VP6, VP7 e não-estruturais NSP1 e NSP4, constatando-se elevada similaridade com o protótipo suíno OSU.

O genótipo G5 já está bem estabelecido como prevalente entre amostras de RVs de origem suína e de origem humana, particularmente no Brasil. Estudos conduzidos por Gouvea et al (1994) demonstraram pela primeira vez a ocorrência deste genótipo nos estados do Rio de Janeiro, São Paulo, Pernambuco e Goiás, entre crianças com diarreia e com uma prevalência de 4,6% (n=329). Desde então, o genótipo G5 vem sendo considerado de importância epidemiológica, tanto no Brasil como em outros países da América do Sul (SANTOS e HOSHINO, 2005).

Em suínos, G5, G3, G4 e G11 têm sido considerados os tipos mais prevalentes em todo o mundo (ROSEN et al, 1994), ainda que G9

tenha emergido no início dos anos 90 (TEODOROFF et al, 2005).

Um dado interessante deve-se ao fato da amostra 204G apresentar maior nível de identidade com a cepa eqüina H-1 do que com a cepa suína OSU (93%). Entretanto, uma análise mais detalhada, incluindo o seqüenciamento de todos os 11 segmentos genômicos da amostra 204G deve ser realizada para explicar tal similaridade, uma vez que o agrupamento dos três isolados em um mesmo ramo do dendograma era esperado.

Com relação à amostra de origem humana analisada neste estudo, Hum-1, observa-se que a mesma foi classificada como G1, apesar da análise por RT-PCR indicar o genótipo G5. Quando submetida ao agrupamento com outras cepas de RVs G5, tanto de origem humana como suína, a amostra Hum-1 não forma um cluster com estas cepas (dados não mostrados), comprovando sua diferença genética.

A ocorrência de G1, G2, G3 e G4 entre amostras de origem humana representa mais de 88% das cepas analisadas em todo mundo (SANTOS E HOSHINO, 2005). Apesar de somente uma amostra de origem humana neste estudo, pode-se inferir que o tipo G1 circulante é o mesmo utilizado como alvo nos programas de imunização contra RVs adotados no mundo todo. No Brasil, desde março de 2006 foi adotado o programa de imunização nacional com a Vacina Oral de Rotavírus Humano (VORH), licenciada no mercado internacional com o nome de Rotarix® e fabricada pelo Laboratório GlaxoSmithKline. Esta é uma vacina elaborada com vírus isolados de humanos e atenuados e é

monovalente, ou seja, a cepa RIX4414 utilizada possui apenas um sorotipo em sua composição que é o G1[P8] (Brasil, 2006).

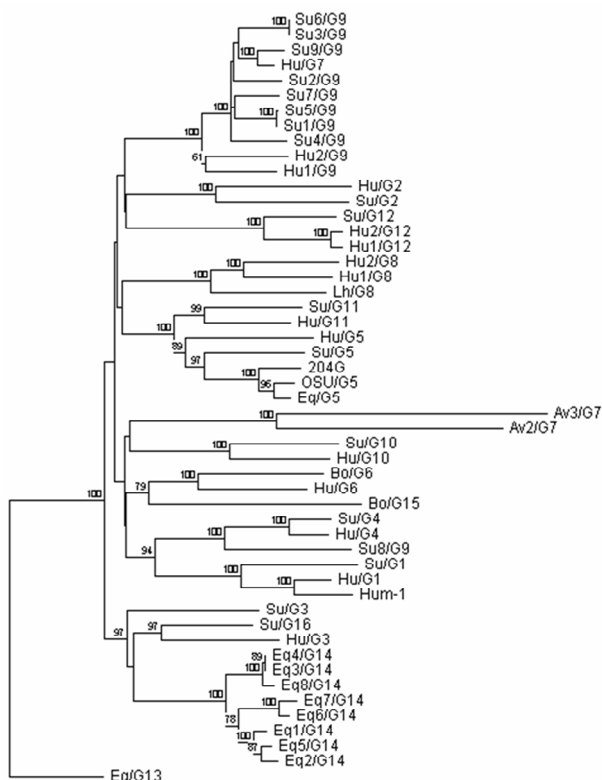
coletadas não se procedeu a coleta de fezes humanas.

## CONCLUSÕES

A análise das seqüências de 79G e Hum-1, anteriormente classificadas por RT-PCR como G3 e G5, permitiu uma melhor caracterização destas amostras, como G9 e G1. Estes resultados demonstram a importância em se proceder ao seqüenciamento das amostras de RVs circulantes, principalmente nos casos em que resultados obtidos por RT-PCR possam ser considerados conflitantes.

A diversidade genética característica dos RVs foi confirmada neste estudo através da similaridade de seqüências observada entre a amostra 79G e a cepa japonesa JP32-4. Os mecanismos genéticos que favorecem esta diversidade devem ser melhor avaliados com o intuito de contribuir para a compreensão da ecologia dos RVs.

Como um dos desafios para eficácia de programas de imunização contra RVs é o surgimento de cepas com genótipos incomuns, o monitoramento constante dos genótipos circulantes se faz necessário, tanto entre amostras de origem humana (como preconizado pela PAHO) como animal, haja vista a possibilidade destes agirem como reservatórios e transmissores da rotavirose.



**Figura 2:** Dendrograma para as amostras 204G e Hum-1, obtida pelo método do vizinho mais próximo (neighbour-joining), de acordo com a seqüência de nucleotídeos de RVs G5 de origem suína e humana. O representante Eeq/G13 foi utilizado como raiz para grupo externo. Os valores de bootstrap (%) são mostrados. As cepas estão referenciadas na Tabela 2.

A estreita relação genética entre amostras suínas e humanas, principalmente no Brasil, é muitas vezes relacionada a condições sanitárias inadequadas e ao contato muito próximo entre humanos e animais domésticos, incluindo suínos (MASCARENHAS et al, 2007). No presente estudo não foi possível tal correlação, haja vista que nas propriedades onde as amostras foram

## REFERÊNCIAS

BRASIL; Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Doença diarreica por rotavírus: Vigilância epidemiológica e prevenção pela vacina oral de rotavírus humano – VORH:

informe técnico. Brasília: Ministerio da Saúde; 2006, p 1-36.

CIARLET, M.; ISA, P.; CONNER, M.E.; LIPRANDI, F. Antigenic and molecular analyses reveal that the equine rotavirus strain H-1 is closely related to porcine, but not equine, rotavirus: interspecies transmission from pigs to horses? **Virus Genes**, 22(1): 5-20, 2001.

FUKAI, K.; TAKAHASHI, T.; TAJIMA, K.; KOIKE, S.; IWANE, K.; INOUE, K. Molecular characterization of a novel bovine group A rotavirus. **Veterinary Microbiology**, v. 123, p. 217-224, 2007.

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. *Journal of Clinical Microbiology*, 30 (6): 1365-1373.

GOUVEA, V., GLASS, R. WOODS, P., TANIGUCHI, K., CLARCK, H.F., FORRESTER, B., FANG, Z.Y. (1990) Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 28 (2): 276-282.

HALL, T. **BioEdit** – version 5.0.6. Raleigh: North Carolina State University, Department of Microbiology, 2001. 192 p.

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. **Journal of Medical Virology**, v. 78, p. 986–994, 2006.

LEWIS, G. D.; METCLAF, T. G. Polyethylene glycol precipitation for recovery of pathogenic viruses, including

hepatitis A virus and human rotavirus, from oysters, water and sediment samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, p. 1983-1988, 1988.

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. Relationships among porcine and human P(6) rotaviruses: evidence that the different human P(6) lineages have originated from multiple interspecies transmission events. **Virology**, v. 344, p. 509-519, 2006.

Mascarenhas, J.D.P; Linhares, A.C.; Gabbay, Y.B.; Lima, C.S; Guerra, S.F.S.; Soares, L.S.; Oliveira, D.S.; Lima, J.C.; Macedo, O.; Leite, J.P.G. Molecular characterization of VP4 and NSP4 genes from rotavirus strains infecting neonates and young children in Belém, Brazil. **Virus Research**, 126: 149-158, 2007.

MENEGHETTI, A. C.; BOLOGNINI, A. M.; LAURETTI, F.; LINHARES, R. E. C.; SANTOS, N.; NOZAWA, C. M. Incidence of group A rotavirus in urban and rural areas of the city of Londrina-Brazil, from 1995 to 1997. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, vol. 44, n. 3, p. 257-261, 2001.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. Regional Meeting on the Implementation of Rotavirus Epidemiological Surveillance: generating information for decision-making. Washington, D.C., p66-70, 2003.

PEER, V.D.Y., WACHTER, D.R. TREECON: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees. *Comput. Applic. Biosci.* 9, 177–182, 1993.

ROSEN, B. I.; PARWANI, A. V.; LOPEZ, S.; FLORES, J.; SAIF, L. J. Serotypic

differentiation of rotaviruses in field samples from diarrheic pigs by using nucleic acids probes specific for porcine VP4 and human and porcine VP7 genes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n 2, p. 311-317, 1994.

SANTOS, N.; HOSHINO, Y. Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implication of an effective rotavirus vaccine. **Reviews in Medical Virology**, v. 15, p. 29-56, 2005.

SANTOS, N.; VOLOTÃO, E. M.; SOARES, C. C.; ALBUQUERQUE, M. C. M.; SILVA, F. M.; CARVALHO, T. R. B.; PEREIRA, C. F. A.; CHIZIKOV, B.; HOSHINO, Y. Rotavirus strains bearing genotype G9 or P[9] recovered from Brazilian children with diarrhea from 1997 to 1999. **Journal of Clinica Microbiology**, v. 39, n. 3, p. 1157-1160, 2001.

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

WANG, Y.H.; KOBAYASHI, N.; ZHOU, D.J.; YANG, Z.K.; ZHOU, Z.; PENG, J.S.; ZHU, Z.R.; ZHAO, D.F.; LIU, M.Q.; GONG, J. Molecular epidemiologic analysis of group A rotavirus in adults and children with diarrhea in Wuhan city, China, 2000-20006. **Arch. Virol.**, 152: 669-685, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. External Review of Burden of Disease Attributable to Rotavirus. Geneva, Switzerland, p. 1-26, 2005.