



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

RÉGIS PILONI MAESTRI

**ANALISE FILOGENÉTICA DE GENES DE PROVÁVEL ORIGEM NÃO HUMANA
DE ROTAVÍRUS DO GRUPO A EM ESPÉCIMES FECAIS DE CRIANÇAS COM
GASTRENERITE AGUDA PROVENIENTES DE BELÉM, BRASIL**

BELÉM
2012

RÉGIS PILONI MAESTRI

**ANALISE FILOGENÉTICA DE GENES DE PROVÁVEL ORIGEM NÃO HUMANA
DE ROTAVÍRUS DO GRUPO A EM ESPÉCIMES FECAIS DE CRIANÇAS COM
GASTREENTERITE AGUDA PROVENIENTES DE BELÉM, BRASIL**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais, do Núcleo de Medicina Tropical, da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Doenças Tropicais.

Orientadora: Prof^a Dr^a Joana D'Arc Pereira Mascarenhas

BELÉM

2012

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP) –
Biblioteca do Núcleo de Medicina Tropical/UFPA, Belém-PA**

Maestri, Régis Piloni

Análise filogenética de genes de provável origem não humana de rotavírus do grupo A em espécimes fecais de crianças com gastroenterite aguda provenientes de Belém, Brasil / Régis Piloni Maestri; orientadora, Joana D'Arc Pereira Mascarenhas. – 2012.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará. Núcleo de Medicina Tropical. Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais. Belém, 2012.

1. Gastroenterite - Crianças - Belém (PA). 2. Infecções por rotavírus – Crianças - Belém. 3. Rotavírus - Filogenia. I. Mascarenhas, Joana D'Arc Pereira, orient. II. Título.

CDD: 22. ed. 576.88

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS TROPICAIS

RÉGIS PILONI MAESTRI

**ANALISE FILOGENÉTICA DE GENES DE PROVÁVEL ORIGEM NÃO HUMANA
DE ROTAVÍRUS DO GRUPO A EM ESPÉCIMES FECAIS DE CRIANÇAS COM
GASTREENTERITE AGUDA PROVENIENTES DE BELÉM, BRASIL**

Dissertação de Mestrado apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Doenças Tropicais

Aprovada em:

Banca Examinadora

Dra. Joana D'Arc Pereira Mascarenhas
Orientadora – Instituto Evandro Chagas

Prof. Dr. Evonnildo Costa Gonçalves - Titular
Universidade Federal do Pará, UFPA

Prof^a. Dr^a. Maisa Silva de Sousa - Titular
Universidade Federal do Pará, UFPA

Prof^a. Dr^a. Yvone Benchimol Gabbay - Titular
Instituto Evandro Chagas, MS, SVS

Prof. Dr^a. Luana da Silva Soares - Suplente
Instituto Evandro Chagas, MS, SVS

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as chances que Ele me proporcionou.

Aos meus pais, João Régis Dalla Maestri e Solange Piloni Maestri, que sempre acreditaram em mim e apoiaram minhas decisões e deram suporte para chegar até aqui.

Aos meus irmãos, Felipe P. Maestri, Alvino Maestri Neto e Mayra P. Maestri, que sempre estiveram e estão na mesma estrada lutando comigo.

A minha esposa, Karen Cristini Yumi Ogawa Maestri, a qual precisou de paciência para entender minha ausência.

A minha SUPER orientadora, Dra Joana D’Arc Pereira Mascarenhas, minha imensa gratidão pela oportunidade a mim dada, os conhecimentos repassados e a paciência dedicada.

Ao Instituto Evandro Chagas na pessoa de sua diretora Dr^a. Elizabeth Santos.

A Seção de Virologia do IEC, representada pelo seu chefe Dr. Alexandre da Costa Linhares.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq pela bolsa fornecida.

A Dr José Paulo Gagliardi Leite do Laboratório de Virologia Comparada, Fiocruz – RJ.

Ao Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará pelo ensino.

A minha “mãe” Euzeni, que me ajudou como podia.

Aos amigos do laboratório de rotavírus Alessilva, Carolina, Daniel, Darivaldo, Delana, Jane Cecília, Jane Kaiano, Luana, René e Sylvia que sempre me deram suporte no desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos de seção de virologia, na, Darleise, Diele, Glicelia, Ivete, Ian Jefferson, Jessy, Jhones, Juliana, Kaio, Luiza, Mila, Samea.

Aos amigos mcorongos do Instituto Esperança de Ensino Superior.

*“Se um problema é grande demais, não pense nele...
E, se ele é pequeno demais, pra quê pensar nele?”*

Ditador Tibetano

Trabalho realizado no Laboratório de Rotavírus da Seção de Virologia do Instituto Evandro Chagas (IEC), da Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS/MS), sob a orientação da Dr^a. Joana D'Arc Pereira Mascarenhas.

RESUMO

Os rotavírus (RVs) são a principal causa de gastroenterites viróticas agudas tanto em seres humanos, como em animais jovens de várias espécies, incluindo bezerros, equinos, suínos, caninos, felinos e aves. A diversidade genética dos RVs está associada a diferentes mecanismos de evolução. Nesse contexto registrem-se: mutação pontual, rearranjo genômico e reestruturação (*reassortment*). O objetivo do presente estudo foi realizar a caracterização molecular dos genes que codificam para as proteínas estruturais e não-estruturais em amostras não usuais de RVs. Os espécimes clínicos selecionados para este estudo foram oriundos de projetos de pesquisa em gastroenterites virais conduzidos no Instituto Evandro Chagas e provenientes de crianças e neonato com gastroenterite por RVs. Os espécimes fecais foram submetidos à reação em cadeia mediada pela polimerase, para os genes estruturais (VP1-VP4, VP6 e VP7) e não estruturais (NSP1-NSP6), os quais foram sequenciados posteriormente. Oito amostras não usuais de RV oriundas de crianças e neonato com gastroenterite foram analisadas evidenciando a ocorrência de eventos de rearranjos entre genes provenientes de origem animal em 5/8 (62,5%) das amostras analisadas. Desta forma, o presente estudo demonstra que apesar de ser rara a transmissão de RVs entre espécies (animais – humanos), ela está ocorrendo na natureza, como o que possivelmente ocorreu nas amostras do presente estudo NB150, HSP034, HSP180, HST327 e RV10109. O estudo é pioneiro na região amazônica e reforça dados descritos anteriormente que demonstram o estreito relacionamento existente entre genes provenientes de origem humana e animal que possam representar um desafio às vacinas ora em uso introduzidas em escala progressiva nos programas nacionais de imunização.

Palavras chave: Gastroenterites. Crianças. Rotavírus. Filogenia.

ABSTRACT

Rotaviruses (RVs) are the main cause of acute viral gastroenteritis in both humans and young animals of species such as calves, horses, pigs, dogs, cats, and birds. The genetic diversity of RVs is related to a variety of evolutionary mechanisms, including point mutation, genome reassortment, and reassortment. The objective of this study was realized the molecular characterization of the genes that encode structural and nonstructural proteins in unusual RV strains. The clinical specimens selected for this study were obtained from children and newborns with RV gastroenteritis, who participated in research projects on viral gastroenteritis conducted at the Evandro Chagas Institute. Structural (*VP1-VP4*, *VP6*, and *VP7*) and nonstructural (*NSP1-NSP6*) genes were amplified from stool samples by the polymerase chain reaction and subsequently sequenced. Eight unusual RV strains isolated from children and newborns with gastroenteritis were studied. Reassortments between genes of animal origin were observed in 5/8 (62.5%) strains analyzed. These results demonstrate that, although rare, interspecies (animal-human) transmission of RVs occurs in nature, as observed in the present study in strains NB150, HSP034, HSP180, HST327, and RV10109. This study is the first of its kind conducted in the Amazon region and supports previous data showing a close relationship between genes of human and animal origin, representing a challenge to the large-scale introduction of RV vaccines in national immunization programs.

Key words: Gastroenteritis. Children. Rotavirus. Phylogeny.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação esquemática das proteínas dos capsídeos externo, intermediário e interno da partícula viral de RVs.....	22
Figura 2	Eletroferotipos de RVs demonstrando os sete grupos.....	25
Figura 3	Modelo esquemático do ciclo de replicação dos RVs. As etapas de replicação estão indicadas nas letras.....	35
Figura 4	Descrição sucinta das amostras que foram objeto de análise.....	43
Figura 5	Filograma representando a classificação das amostras do estudo em diferentes genótipos G de VP7.....	56
Figura 6	Filograma representando a classificação das amostras do estudo em diferentes genótipos P[] de VP4.....	57
Figura 7	Filograma representando a classificação das amostras do estudo em diferentes genótipos I de VP6.....	58
Figura 8	Filograma representando a classificação das amostras do estudo em diferentes genótipos R de VP1.....	59
Figura 9	Filograma representando a classificação das amostras do estudo em diferentes genótipos C de VP2.....	60
Figura 10	Filograma representando a classificação das amostras do estudo em diferentes genótipos M de VP3.....	61
Figura 11	Filograma representando a classificação das amostras do estudo em diferentes genótipos A de NSP1.....	64
Figura 12	Filograma representando a classificação das amostras do estudo em diferentes genótipos N de NSP2.....	65
Figura 13	Filograma representando a classificação das amostras do estudo em diferentes genótipos T de NSP3.....	66
Figura 14	Filograma representando a classificação das amostras do estudo em diferentes genótipos E de NSP4.....	67
Figura 15	Filograma representando a classificação das amostras do estudo em diferentes genótipos H de NSP5/6.....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Valores de cut-off de percentagem de identidade nucleotídica que diferem os diversos genotipos de RVs considerando os 11 segmentos genômicos.....	24
Tabela 2	Distribuição do genotipo G RVs em várias espécies de animais.....	28
Tabela 3	Distribuição do genotipo P[] RVs em várias espécies de animais...	29
Tabela 4	Características dos estudos sobre RVs realizados em Belém, Pará, no período de 1992 a 2006, cujos espécimes fecais foram utilizados nesta pesquisa.....	45
Tabela 5	Reagentes utilizados para uma amostra, na obtenção do cDNA por meio da transcrição reversa, na reação de RT-PCR.....	47
Tabela 6	Reagentes utilizados para uma amostra, para a amplificação pela PCR, da RT-PCR.....	48
Tabela 7	Sequência dos iniciadores utilizados na RT-PCR e no sequenciamento de nucleotídeos dos genes que codificam as proteínas estruturais e não-estruturais de RV.....	49
Tabela 8	Constelação de genotipos analisados neste estudo.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus centígrados
µL	Microlito
µM	Micromolar
Aa	Aminoácido
BLAST	Basic local alignment search tool
cDNA	DNA complementar
dATP	Desoxiadenina
dCTP	Desoxicitosina
dGTP	Desoxiguanina
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo
dsRNA	Dupla fita de Ácido Ribonucléico
dTTP	Desoxitimina
EGPA	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida
IEC	Instituto Evandro Chagas
ME	Microscópio eletrônico
mM	Milimolar
NJ	Neighbor-joining
NMT	Núcleo de Medicina Tropical
NSP	Proteína não estrutural
OMS	Organização Mundial de Saúde
ORF	Região de leitura aberta
pb	Pares de Base
PCR	Reação em Cadeia mediada pela Polimerase
q.s.p.	quantidade suficiente para
RNA	Ácido Ribonucléico
RT-PCR	Reação em Cadeia mediada pela Polimerase precedida de Transcrição Reversa
RVs	Rotavírus
RVs-A	Rotavírus grupo A
SAVIR	Seção de Virologia

TA Temperatura Ambiente
UFPA Universidade Federal do Pará

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	16
2.	JUSTIFICATIVA	18
3.	OBJETIVOS	19
3.1	OBJETIVO GERAL	19
3.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
4	REFERENCIAL TEÓRICO	20
4.1.	GASTREENTERITE VIRAL	20
4.2.	O ROTAVÍRUS	20
4.2.1	Histórico	20
4.2.2.	Partícula viral	21
4.2.3.	Classificação	23
4.2.4.	Genoma	25
4.2.5.	Epidemiologia Molecular dos RVs	26
4.2.6.	Proteínas Estruturais	27
4.2.7.	Proteínas Não-Estruturais	30
4.2.8.	Replicação Viral	32
4.2.9.	Mecanismo de Evolução Genética	34
4.2.10.	Transmissão	36
4.2.11.	Patogenia	37
4.2.12.	Manifestações Clínicas	38
4.2.13.	Imunização	39
5.	MATERIAL E MÉTODOS	39
5.1.	ASPECTOS ÉTICOS E DE BIOSSEGURANÇA	39
5.2.	PACIENTES E ESPÉCIMES CLÍNICOS	40
5.3.	SUSPENSÕES FECAIS	45
5.4.	EXTRAÇÃO DO GENOMA VIRAL	45
5.5.	REAÇÃO EM CADEIA MEDIADA PELA POLIMERASE PRECEDIDA DE TRANSCRIÇÃO REVERSA (RT-PCR)	46
5.6.	ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE	49
5.7.	PURIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO cDNA	49
5.8.	SEQUENCIAMENTO DE NUCLEOTÍDEOS E ANÁLISE	

	FILOGENÉTICA.....	50
6.	RESULTADOS	51
6.1.	GENES ESTRUTURAIIS:.....	54
6.2.	GENES NÃO-ESTRUTURAIIS:.....	62
7.	DISCUSSÃO	69
8.	CONCLUSÕES	74
9.	PERSPECTIVAS	75
	REFERÊNCIAS	76
	APÊNDICE	96
	ANEXO	135

1. INTRODUÇÃO

Considera-se diarreia aguda uma doença infecciosa, em geral de curso auto-limitado, que pode variar de algumas horas podendo perdurar por até 14 dias. É caracterizada pelo aumento do número de evacuações que se manifesta clinicamente por três ou mais evacuações em 24h, com fezes aquosas ou semi-sólidas, acompanhadas de febre, vômitos, cólicas e desidratação (OLIVEIRA, et al., 2007; BRASIL, 2006; MOTA et al., 1994; SOUZA et al., 2002).

A diarreia aguda pode ser ocasionada por vários patógenos, com destaque para os agentes bacterianos, virais e parasitários. Os agentes bacterianos são mais importantes nos países em desenvolvimento, com destaque para a *Escherichia coli*, principalmente do grupo enteropatogênico clássico (EPEC), enquanto que os agentes virais são relevantes tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento, contribuindo para as elevadas taxas de hospitalização e pe altos índices de morbi-mortalidade infantil, respectivamente (OLIVEIRA et al., 1998; 2007; PEREIRA, 2003).

Estima-se que os rotavírus (RVs) sejam responsáveis pela morte de 453 mil crianças menores de 5 anos, ou seja, de cada 260 crianças nascidas ao ano, uma morre de diarreia por RVs antes do seu quinto aniversário (ESTES E KAPIKIAN, 2007). Embora a proporção de RVs em crianças hospitalizadas com diarreia : maior em países desenvolvidos, a maioria das mortes relacionadas aos l encontra-se nos países em desenvolvimento (TATE et al., 2011).

Os RVs são a principal causa de gastroenterite viral aguda tanto em seres humanos, como em animais jovens de várias espécies, incluindo bezerras, equinos, suínos, caninos, felinos e aves (ESTES E KAPIKIAN, 2007; MÜLLER E JOHNE, 2007).

A principal via de transmissão dos RVs é a fecal-oral, embora se postul transmissão pela via respiratória, por meio de aerossóis, bem como por fômites (ESTES E KAPIKIAN, 2007; SATTAR et al., 1994; ZHENG et al., 1991).

Os RVs ocasionam cerca de 125 milhões de episódios diarreicos agudos em todo mundo a cada ano, com 25 milhões de consultas, 2 milhões de hospitalizações e mais de 453 mil óbitos entre crianças menores de cinco anos de idade, sendo que 85% ocorrem nos países em desenvolvimento (TATE et al., 2011; AFONSO E

ANTUNES, 2007; MILLER E MCANN, 2001; PARASHAR et al., 2003; 2006). Nos países desenvolvidos, onde as condições de saneamento e higiene são satisfatórias, os RVs se associam a ocorrências epidêmicas, embora o número de óbitos seja limitado (GLASS, 2006; GLASS E PARASHAR, 2006).

Os RVs são membros da família *Reoviridae* e seu genoma é constituído por 11 segmentos de RNA de dupla fita (dsRNA). Tais segmentos codificam 12 proteínas: seis estruturais (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 e VP7) e seis não estruturais: (NSP1, NSP2, NSP3, NSP4 e NSP5/6) (ESTES E KAPIKIAN, 2007).

A classificação dos RVs do Grupo A é baseada em uma combinação binária envolvendo os genes *VP4* (genótipos P) por revelar-se sensível à **protease**, e *VP7* (genótipos G) de **glicoproteína**. Contudo, recentemente foi proposto por Matthijnsens et al. (2008a) uma nova classificação dos RVs com base na análise dos 11 genes virais, a fim de proporcionar um melhor entendimento acerca da função de cada proteína bem como compreender o relacionamento evolucionário entre espécies desses vírus. A análise das proteínas estruturais e não-estruturais de RVs se faz necessária principalmente no que se refere a uma possível transmissão envolvendo RVs de origem humana e animal e melhor compreensão acerca das relações genéticas e evolução desses vírus (MATTHIJNSSENS et al., 2008a).

Nos estudos conduzidos em Belém, Brasil em neonatos e crianças com diarreia foi observado similaridade com amostras de origem suína para os genes *VP4* e *NSP4* (MASCARENHAS et al., 2007a, b). DA SILVA et al., (2011) caracterizaram parcialmente os genes VP1, VP2 e VP3 de amostras brasileiras de genótipo P[8]G5 e sugeriram que estes genes poderiam ter se originado a partir de estirpes suína e humana. Desta maneira o monitoramento das amostras circulantes de RVs é importante em um cenário de pós-introdução das vacinas contra RVs. Com efeito, a emergência de amostras não usuais pode representar um importante desafio à efetividade vacinal. O objetivo do presente estudo foi realizar a caracterização molecular dos genes que codificam para as proteínas estruturais e não-estruturais em amostras não usuais de RVs provenientes de crianças e neonato com gastroenterite aguda em Belém, Brasil.

2. JUSTIFICATIVA

Até o momento, estudos sobre a caracterização molecular dos 11 genes ainda são escassos no mundo, principalmente no que tange a possível transmissão entre espécies envolvendo RVs de origem humana e animal (MUKHERJEE et al., 2009; SUBODH et al., 2006; VARGHESE et al., 2006).

Os resultados de vários estudos de vigilância epidemiológica tem relatado um número crescente de segmentos gênicos de origem animal, principalmente aqueles que codificam os genótipos G e P, vêm sendo identificados, em espécimes fecais humanos, em diferentes partes do mundo, fornecendo evidências de que os animais podem atuar como uma fonte de vírus para a diversificação gênica dos RVs humano (SANTOS E HOSHINO, 2005; GENTSCH et al., 2005; LEITE et al., 1996; GOUVEA E SANTOS, 1999; MASCARENHAS et al., 2002; MARTELLA et al., 2010).

Desta maneira, o conhecimento da heterogeneidade genética marcante nos 11 segmentos de RNA de dupla fita em diferentes cepas de RVs bem como evidências que dão suporte para a transmissão entre espécies, como resultado de múltiplos rearranjos, se reveste da maior importância visto que os RVs apresentam vários mecanismos de diversidade genética, levando a evolução desses vírus.

No Brasil estudos sobre os 11 genes de RVs estão sendo conduzidos no Rio de Janeiro, Vitória e Manaus (SILVA, 2009; TORT, 2009) e em amostras circulantes em Belém, Pará. Nesse sentido, a análise dos genes codificantes para as proteínas estruturais e não estruturais de RVs faz-se necessária a fim de ampliar o conhecimento sobre o papel dessas proteínas no estabelecimento da doença. Este estudo constitui a primeira pesquisa conduzida em Belém envolvendo a análise desses genes.

Diante desse panorama, justifica-se a necessidade da realização de estudos relacionados aos 11 genes dos RVs em amostras circulantes na região visando o conhecimento do perfil genético assumido por este vírus em Belém, Pará. Portanto, com este projeto o IEC estará inserido em um contexto nacional e internacional com relação aos estudos sobre RVs.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Realizar a análise genética dos genes que codificam para as proteínas estruturais e não estruturais de rotavírus não usuais do grupo A em espécimes fecais de crianças e neonato com gastroenterite aguda em Belém, Pará.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Realizar a padronização da RT-PCR dos genes VP1, VP2, VP3, NSP1, NSP2, NSP3 e NSP5/6
- II. Verificar a possível quebra de barreira entre espécies;
- III. Determinar os genótipos de RVs com base na classificação envolvendo os 11 genes.

4. REFERENCIAL TEÓRICO

4.1. GASTREENTERITE VIRAL

A diarreia aguda é caracterizada pelo aumento do número de evacuações, com fezes aquosas ou semi-sólidas acompanhadas de febre, vômitos e cólicas, podendo perdurar por até 14 dias. O impacto que esta doença ocasiona está relacionado principalmente aos danos à saúde da população infantil, bem como no contexto da sociedade em geral (BRASIL, 2006).

A diarreia aguda pode ser ocasionada por vários agentes, com destaque para os agentes bacterianos, virais e parasitários. Os agentes bacterianos são relativamente mais importantes nos países em desenvolvimento, com destaque para a *Escherichia coli*, principalmente do grupo enteropatogênico clássico (EPEC), enquanto os agentes virais são relevantes em países desenvolvidos e naqueles em desenvolvimento, contribuindo para as elevadas taxas de hospitalização e pelos altos índices de morbi-mortalidade infantil, respectivamente (OLIVEIRA et al., 1998; 2007; PEREIRA, 2003; VRANJAC, 2004).

Os RVs são membros da família *Reoviridae* e seu genoma é constituído por 11 segmentos de RNA de fita dupla (dsRNA). São considerados a principal causa de gastroenterites viróticas agudas tanto em seres humanos, como em animais jovens de várias espécies, incluindo bezerras, equinos, suínos, caninos, felinos e aves (ESTES E KAPIKIAN, 2007; MÜLLER E JOHNE, 2007).

4.2. OS ROTAVÍRUS

4.2.1. Histórico

O primeiro vírus implicado como agente etiológico de doenças diarreicas em seres humanos foi descrito no início dos anos 70 (século XX), devido à visualização, por meio da microscopia eletrônica (ME), de partículas de 27 nm, que são atualmente denominadas norovírus (KAPIKIAN et al., 1972).

Em um estudo conduzido por Bishop et al. (1973) em Melbourne, Austrália, com crianças que apresentavam diarreia grave de origem não bacteriana, o RVs foi detectado pela primeira vez em finas seções do epitélio duodenal, utilizando a técnica de visualização direta por microscopia eletrônica, e concomitantemente identificado na Inglaterra por Flewett et al. (1973). Algumas de suas primeiras denominações foram Orbivirus-like (BISHOP et al., 1973), Reovirus-like agent (KAPIKIAN et al., 1974) e Duovirus (DAVIDSON et al., 1975), porém, por apresentar na microscopia eletrônica o aspecto de uma “roda” Flewett e Woode, (1978) os denominaram de RVs.

No Brasil, a primeira detecção do RVs ocorreu no ano de 1976, em Belém, Pará, em um estudo-piloto conduzido no Hospital da Santa Casa de Misericórdia do Pará, envolvendo crianças com gastroenterite aguda sob atendimentos ambulatorial e hospitalar (LINHARES et al., 1977).

4.2.2. Partícula viral

A partícula viral infecciosa (vírion) é não-envelopada, com nucleocapsídeo com simetria icosaédrica, medindo 70 nm a 90 nm de diâmetro. Estruturalmente os RVs são formados por três camadas protéicas concêntricas: capsídeo externo, capsídeo intermediário e o capsídeo interno (Figura 1), que contém genoma formado por ácido ribonucléico de dupla fita (dsRNA) de natureza segmentada (MERTENS, 2004). Associadas ao dsRNA no core, encontram-se além da enzima transcriptase, três proteínas estruturais: VP1, VP2 e VP3, codificadas pelos segmentos 1, 2 e 3, respectivamente. Essas proteínas representam em conjunto aproximadamente 18% das proteínas virais, sendo a proteína VP2, a mais abundante e a que mais interage com a proteína VP6 e com o genoma viral (JAYARAM et al., 2004). O capsídeo intermediário é formado pela proteína VP6, codificada pelo segmento 6, sendo a mais abundante (51%), e que determina os antígenos grupo-específicos (A-G), sendo uma das mais importantes proteínas estruturais (ESTES E KAPIKIAN, 2007; JAYARAM et al., 2004).

O capsídeo externo é formado pelas proteínas estruturais VP7 e VP4. A proteína VP4 é responsável pelos sorotipos/genotipos **P** (sensível à **p**rotease) sendo codificada pelo gene 4. Estruturalmente se apresenta com 60 espículas constituídas

por cerca de 10 a 12 nm que se projetam da matriz protéica, compreendendo 1,5% da partícula viral e desempenhado importante papel no mecanismo da penetração viral na célula. A proteína VP7 é uma **G**licoproteína que compõe 30% da partícula viral. Forma a matriz do capsídeo externo e se associa à produção de anticorpos neutralizantes, determinante dos sorotipos/genotipos G.

A VP7 e VP4 atuam induzindo, separadamente, a produção de anticorpos neutralizantes, sendo que a VP4 possui propriedades adicionais como virulência e hemaglutinação (ESTES E KAPIKIAN, 2007; JAYARAM et al., 2004).

Outras cinco proteínas não-estruturais são codificadas, estando presentes apenas na célula infectada e exercendo funções vitais para a infectividade e replicação das partículas virais sendo assim denominadas: NSP1, NSP2, NSP3, NSP4 e NSP5/6 (ESTES E KAPIKIAN, 2007).

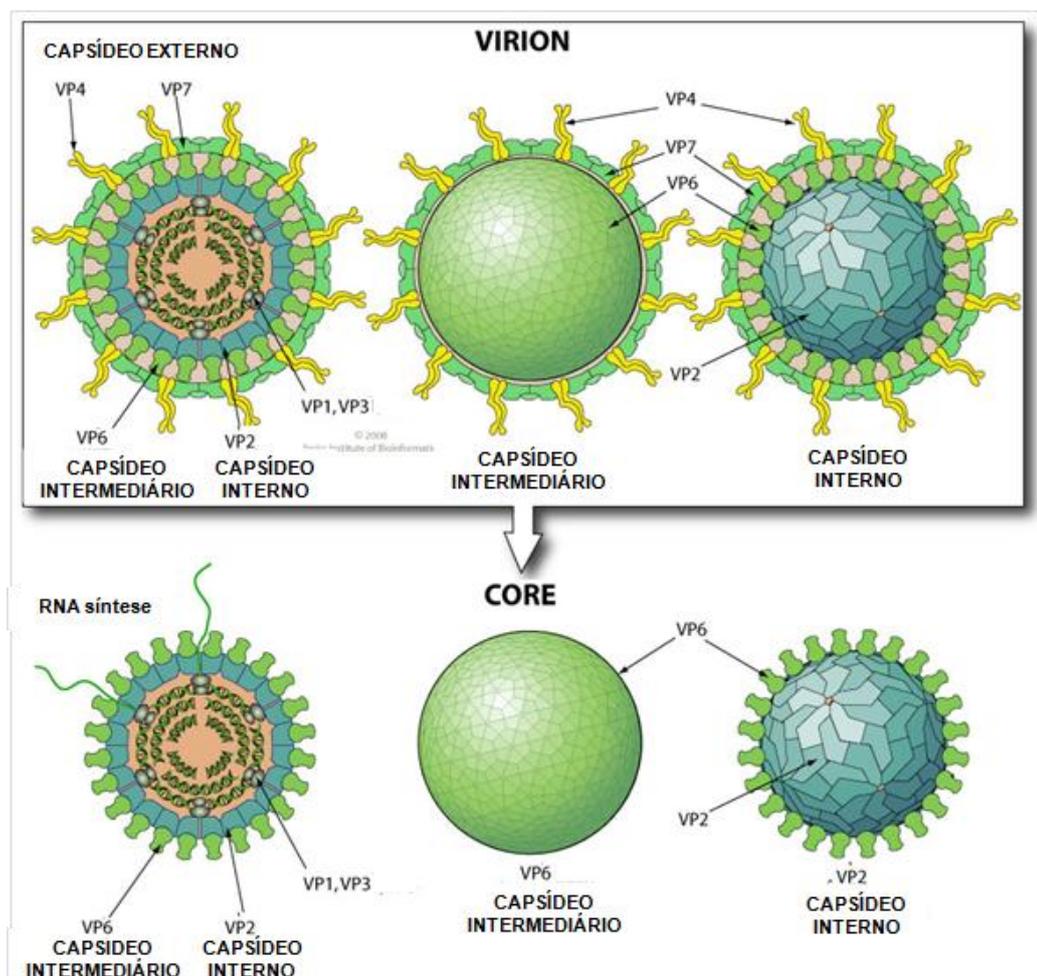


Figura 1 - Representação esquemática das proteínas dos capsídeos externo, intermediário e interno da partícula viral de RVs.

Fonte: Adaptada de Swiss Institute Of Bioinformatics (2008).

4.2.3. Classificação

Os RVs pertencem à família *Reoviridae*, gênero *Rotavirus*. Apresentam três especificidades antigênicas, quais sejam, grupo, subgrupo e genotipo. Até o momento estão classificados em sete grupos sorologicamente distintos (A-G) dependendo dos diferentes epítomos presentes na proteína de capsídeo intermediário VP6. Os grupos A, B e C têm sido detectados acometendo seres humanos e animais, enquanto os demais foram identificados apenas em animais. Os integrantes do grupo A são os RVs mais amplamente dispersos, sendo predominantes na natureza e associados à diarreia no homem e em diversas espécies animais, apesar de o grupo C já ter sido detectado em surtos e casos esporádicos na região amazônica (ESTES E KAPIKIAN, 2007; GABBAY et al., 1999; 2008).

Dentro do grupo A são definidos subgrupos (SG) e sorotipos/genotipos segundo suas características sorológicas e moleculares. A proteína VP6 é responsável pela especificidade de diferentes SG, pela presença ou ausência de epítomos imunoreativos frente a determinados anticorpos monoclonais, denominados como SGI, SGII, SGI+II e SG não I e não II (ESTES E KAPIKIAN, 2007; GREENBERG et al., 1983;). O SGII é o mais frequente entre os humanos, enquanto o SGI é mais detectado entre as amostras de origem animal (DESSELBERGER, 1996; ITURRIZA-GÓMARA et al., 2002).

Os grupos designados B a G compreendem, em geral, amostras que infectam animais, com a proteína VP6 diferente daquela comum aos RVs integrantes do grupo A. Tais amostras não são detectadas por técnicas sorológicas convencionais, sendo sua identificação em geral efetuada por imunomicroscopia eletrônica, eletroforese do dsRNA em gel de poliacrilamida (EGPA) e metodologias moleculares (ESTES E KAPIKIAN, 2007).

Os sorotipos por sua vez, são determinados por anticorpos monoclonais específicos e testes de neutralização, enquanto que os genotipos são determinados por métodos de biologia molecular. Neste contexto são reconhecidos 27 genotipos/sorotipos “G” e 35 diferentes genotipos “P”, com 14 sorotipos “P” (MATTHIJNSSENS et al., 2011).

O tipo P é descrito com a letra P e entre colchetes o número do sorotipo e/ou genotipo correspondente, já o tipo G vem acompanhado do número (ESTES E KAPIKIAN, 2007).

MATTHIJNSSENS et al. (2008a), propôs uma nova classificação genômica dos RVs, baseada nas características moleculares dos genes que codificam para as proteínas: VP7 - VP4 - VP6 - VP1 - VP2 - VP3 - NSP1 - NSP2 - NSP3 - NSP4 - NSP5/6, designando-se Gx - P[x] - Ix - Rx - Cx - Mx - Ax - Nx - Tx - Ex - Hx, respectivamente. Para cada um dos 11 segmentos genômicos são descritos valores de *cut-off* específicos de identidade nucleotídica, (Tabela 1), sendo esses valores baseados na caracterização molecular e análise filogenética do genoma de 53 amostras que foram designados como modelo padrão (protótipos) para a caracterização dos RVs.

Tal classificação visa proporcionar um melhor entendimento acerca da função de cada proteína codificada por esses segmentos genômico bem como compreender o relacionamento evolucionário entre espécies desses vírus (MATTHIJNSSENS et al., 2008b).

Tabela 1 - Valores de *cut-off* de percentagem de identidade nucleotídica que diferem os diversos genotipos de RVs considerando os 11 segmentos genômicos.

Gene	Valores <i>cut-off</i> de identidade nucleotídica (%)	Genotipo	Designação do nome dos genotipos
VP7	80	19G	G licoproteína
VP4	80	27P	Sensível a P rotease
VP6	85	11I	Capsídeo I nterno
VP1	83	4R	R NA polimerase – RNA dependente
VP2	84	5C	Proteína do C ore
VP3	81	6M	M etiltransferase
NSP1	79	14A	A ntagonista do Interferon
NSP2	85	5N	N TPase
NSP3	85	7T	Intensificador da T radução
NSP4	85	11E	E nterotoxina
NSP5/6	91	6H	Fosfoproteína (pH osphoprptein)

Fonte: adaptado de Matthijnsens et al. (2011).

4.2.4. Genoma

Os RVs possuem 11 segmentos de dsRNA, que codificam 12 proteínas, inseridos no core viral, reunindo aproximadamente 18.522 pares de base (pb), rico em adenina e uracila, sendo que os segmentos variam em tamanho de 667 a 3.302 pb, do menor para o maior gene. Desta maneira, cada segmento é responsável pela síntese de uma única proteína, com exceção do 11º que codifica duas proteínas (NSP5 e NSP6). Os RVs representam os únicos agentes virais conhecidos por possuir 11 segmentos de dsRNA infectando tanto mamíferos como aves (Figura 2) (ESTES E KAPIKIAN, 2007; RAMIG, 2004).

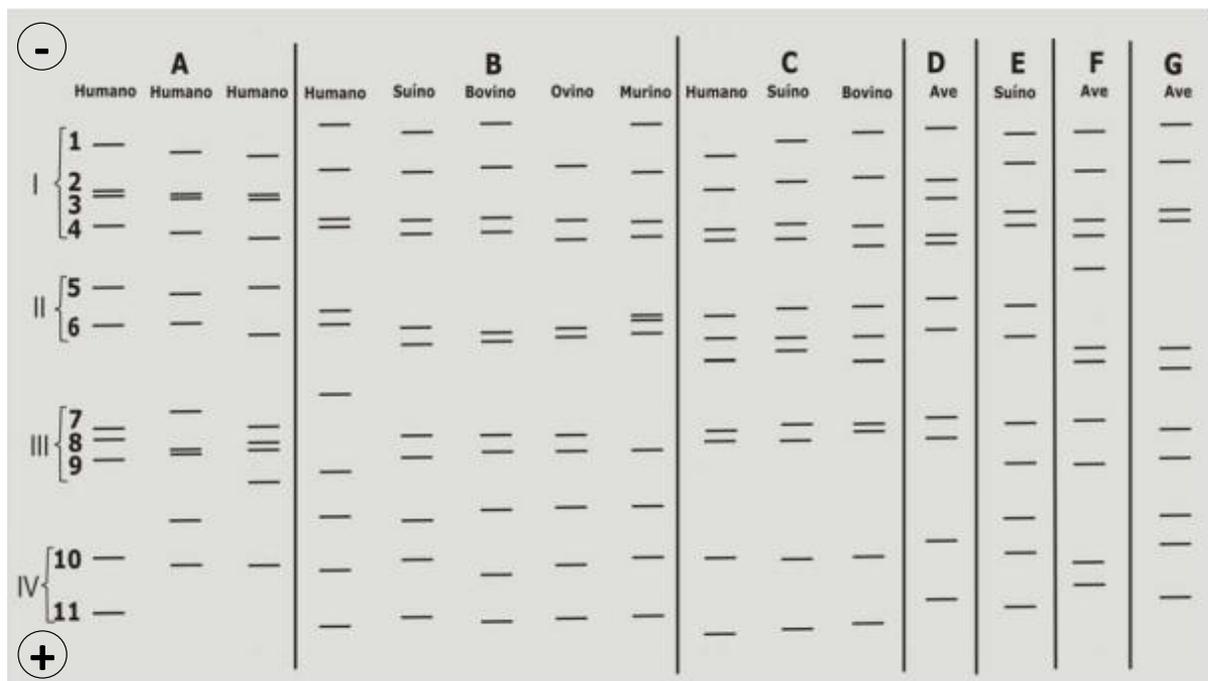


Figura 2 – Eletroferotipos de RVs demonstrando os sete grupos.

Fonte: adaptada de Kapikian et al. (2001).

A eletroforese em gel de poliacrilamida, é uma técnica relativamente fácil e rápida, além de detectar todos os grupos de RVs, ainda evidencia o polimorfismo genômico das diversas amostras circulantes. Os rotavírus do grupo A são os mais importantes, uma vez que predominantemente infectam seres humanos. Em relação aos dos grupos B e C, são isolados de animais como bovinos, caninos e suínos, sendo encontrados esporadicamente infectando seres humanos, uma vez que já

foram relatados casos de diarreia associados a esses vírus. Já os dos grupos D, E, F e G infectam apenas animais. A configuração 4:2:3:2 é típica dos RVs do Grupo A, e a 5:1:3:2 caracteriza-se como a distribuição dos fragmentos genômicos observada tipicamente em aves. Os integrantes dos grupos B e D denotam padrão 4:2:2:3, e o C, por sua vez, 4:3:2:2 (ESTES E KAPIKIAN, 2007).

Os dsRNAs não são infecciosos, refletindo o fato de que as partículas virais contém suas próprias RNA polimerases dependente de RNA (RNA-dependente viral) para transcrever os segmentos individuais de RNA em RNA mensageiros (*mRNA*). Os segmentos genômicos têm uma estrutura semelhante, sendo que no sentido 5' → 3' a sequência dos genes inicia com uma guanina, seguida por região não codificante. Logo após é encontrada uma longa “fase leitura aberta de” (*ORF- open reading frame*) para codificação da proteína, acompanhada de um códon de “terminação” e novamente uma área não codificadora finalizada por citosina. Os segmentos de RNA não apresentam sinal de poliadenilação e são ricos em adenina e uracila (58% a 67%) (ESTES E KAPIKIAN, 2007).

4.2.5. Epidemiologia molecular dos RVs

Estudos têm demonstrado a ampla diversidade genética de RVs circulantes no mundo (LEITE et al., 2008; SANTOS E HOSHINO, 2005; GURGEL et al., 2008). Relatos na literatura descrevem 27 genótipos/sorótipos “G” e 35 P [], sendo que os vários tipos G e P tendem a segregar de acordo com padrões espécie-específicos em diversas espécies animais, como demonstrado nas Tabelas 2 e 3. (MATTHIJNSSENS et al., 2008b; MARTELLA et al., 2010).

No que tange às infecções nosocomiais por rotavírus no Brasil, a principal investigação ocorreu no período de 1992 a 1994 e envolveu 237 crianças atendidas em um hospital público de Belém. Os dados dessa investigação demonstraram que os Rvs foram responsáveis por cerca de 30% dos episódios diarréicos desenvolvidos no decorrer da internação, bem como 7% das infecções assintomáticas entre crianças menores de cinco anos (GUSMÃO et al., 1994).

As combinações binárias ocorridas entre o genótipos G e P [] de RVs podem ser usuais e não-usuais. As usuais contemplam os genótipos G1P[8], G2P[4], G3P[8] e G4P[8] e G9P[8] correspondendo a 90% (ou mais) das infecções do

mundo, sendo que alguns genótipos podem periodicamente ter maior relevância em determinadas localidades, como o G5P[8] no Brasil nos anos 90 (século XX) (SANTOS e HOSHINO, 2005; GENTSCH et al., 2005). As demais combinações, consideradas não usuais, são menos frequentes e representam uma média de 4,9% das infecções descritas em todo o mundo.

Os genótipos não usuais podem surgir a partir de infecções mistas, sugerindo uma constante troca de material genético entre as amostras de RVs humano ou entre amostras de RVs humano e animal (MASCARENHAS et al., 2002; ITURRIZA-GÓMARA et al., 2001; SANTOS e HOSHINO, 2005; MASCARENHAS et al., 2007a).

Estudos envolvendo a caracterização molecular de RVs são importantes, tanto para o monitoramento de amostras circulantes quanto para identificar a presença de novos genótipos, principalmente no cenário pós implantação da vacina, o qual pode sofrer interferências a longo prazo devido a tal diversidade (RAMACHANDRAN et al., 1998; RAHMAN et al., 2005a; LEITE et al., 2008; KHAMRIN et al., 2007; MATTHIJNSSENS et al., 2009).

4.2.6. Proteínas Estruturais

VP1. A proteína VP1, codificada pelo segmento 1 do dsRNA, é constituinte do core viral e integrante do complexo de replicação viral, atuando como uma RNA polimerase RNA dependente. Entre as proteínas do core é a única que possui uma sequência específica de reconhecimento ao RNA viral (ESTES E KAPIKIAN, 2007; MERTENS, 2004).

VP2. A proteína VP2, codificada pelo segmento 2, faz parte do complexo de replicação devido a sua capacidade de ligação com o RNA viral por meio dos resíduos N-terminais, sendo a proteína mais abundante no core (ESTES E KAPIKIAN, 2007; JAYARAM et al., 2004).

VP3. A proteína VP3, codificada pelo segmento 3, possui atividade metiltransferase, guaniltransferase e participa do processo de transcrição viral juntamente com a proteína VP1, ligando-se ao RNA de fita simples (ESTES E KAPIKIAN, 2007).

VP4. Proteína não glicosilada que forma projeções diméricas a partir do capsídeo externo de vírions maduros. Tem sido descrita como determinante dos

eventos funcionais importantes como adesão à célula, internalização, hemaglutinação e neutralização (DUNN et al., 1995; LUDERT et al., 1996). A VP4 é susceptível à tripsina, o que resulta no aumento da infectividade viral e facilita a entrada do vírus na célula. É clivada por ação da enzima proteolítica tripsina, dando origem a um fragmento, N-terminal, VP8* (28 kDa), e um fragmento C-terminal, VP5* (60 kDa), processo este que confere a esta proteína uma função determinante para a entrada do vírus na célula hospedeira. O peptídeo VP5* está associado com a atividade de neutralização cruzada entre os diferentes tipos de VP4 e, possivelmente, possui os epítomos responsáveis pela adsorção do vírus à célula. O peptídeo VP8*, por outro lado, contém a maioria dos epítomos associados às reações tipo-específicas (ESTES E KAPIKIAN, 2007; JAYARAM et al., 2004)

Tabela 2 - Distribuição do genotipo G de RVs de várias espécies de animais.

- - Círculos cheios indicam que o genotipo G é epidemiologicamente relevante para a espécie.
- - Círculos vazios indicam descrição esporádica ou relevância epidemiológica baixa do genotipo G.

Genotipo (G)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	
Humano	●	●	●	●	○	○		○	●	○	○	●								
Suíno	○	●	●	●	●	○		○	●	○	●	○								
Símio			●					○												
Bovino	○		○		○	●		●		●									○	
Ovino / Caprino			○			●		●	○	●					●					
Equino			●		●			○		○			●	●						
Canino			●																	
Felino			●																	
Camundongo																●				
Coelho			●																	
Aves							●											●	●	●

Fonte: adaptada de Martella et al. (2010).

Tabela 3 - Distribuição do genotipo P[] de RVs de várias espécies de animais.

- - Círculos cheios indicam que o genotipo P[] é epidemiologicamente relevante para a espécie.
- - Círculos vazios indicam descrição esporádica ou relevância epidemiológica baixa do genotipo P[].

Genotipo (P[])	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
Humano	○		○	●	○	●	○	●	●	●	●			●					○							●	
Suíno	○				○	●	●	○			○		●						●				●			●	●
<i>Símio</i>	○	●	●																					●			
Bovino	●		○		●						●			○	●						●						
Ovino / Caprino	●		○		●			○			●			○	●			●									
Equino	○						○				○	●															
Canino			●																								
Felino			●						●																		
Camundongo																●					●						
Coelho														●									●				
Aves																											●

Fonte: adaptada de Martella et al. (2010)

VP6. Proteína viral mais abundante e a principal portadora dos determinantes antigênicos. Compõe o capsídeo interno e é formada por dois domínios, um interagindo com a proteína VP7 e outro com a VP2. Devido sua organização na partícula viral, está envolvida nas duas principais funções do vírus, quais sejam, o processo de entrada na célula hospedeira e a replicação viral, por meio de sua interação com a proteína VP2 e com as proteínas VP4 e VP7. Os resíduos de aminoácidos 296 a 259 e 305, são importantes no reconhecimento pelos anticorpos monoclonais (MAbs) de subgrupo (ESTES E KAPIKIAN, 2007; JAYARAM et al., 2004).

VP7. Glicoproteína mais imunogênica do capsídeo externo e responsável pela síntese de anticorpos neutralizantes. Acredita-se que esta proteína possa modular a atividade da VP4 no processo de adsorção e entrada do RVs na célula. Tem a capacidade de interagir com moléculas da superfície celular, uma vez que a proteína VP4 tenha iniciado o processo de adsorção (BEISNER et al., 1998; ESTES E KAPIKIAN, 2007; JAYARAM et al., 2004; MENDEZ et al., 1996). Diferentes estudos têm demonstrado que concentrações apropriadas de cálcio (Ca^{++}) são necessárias para se manter a estabilidade da partícula, aparentemente pela estabilidade da glicoproteína VP7. A VP7 apresenta uma ORF composta de 326 aminoácidos (aa) com dois códons de iniciação. Cada uma dessas regiões precede domínios hidrofóbicos designados de H1 (aa 6-23) e H2 (aa 33-44), que podem funcionar como uma sequência sinalizadora para dirigir a VP7 para o retículo endoplasmático (RE). Um terceiro códon de iniciação também está presente antes do segundo domínio hidrofóbico. Algumas amostras do vírus contêm até três sítios potenciais de glicosilação, contudo, somente dois sítios são aparentemente usados (KAPIKIAN et al., 2001).

4.2.7. Proteínas não-estruturais

Todas as seis proteínas não estruturais (NS) são encontradas nas células infectadas, porém não no vírion. São codificadas pelos segmentos 5, 7, 8, 10 e 11 e designadas de NSP1, NSP2, NSP3, NSP4 e NSP5/6, sendo que o segmento 11 é o único de codifica duas proteínas (NSP5 e NSP6). Tais proteínas estão envolvidas na replicação, interagindo com o ácido nucléico.

NSP1. Proteína codificada pelo segmento 5 do dsRNA viral. Apresenta associações com o citoesqueleto celular favorecendo a ligação do vírus à célula. É a proteína viral menos conservada por apresentar elevada diversidade, mostrando maior variabilidade de sequência do que VP4 e VP7. Possui domínios relativamente conservados (*zinc finger*), contudo, evidenciou não ser uma proteína essencial à replicação e virulência viral, já que não está presente em todas as variantes. Está envolvida no escape imune viral, atuando como antagonista do interferon tipo I (IFN) por diversos mecanismos (ESTES E KAPIKIAN, 2007; GRAFF et al., 2009; MERTENS, 2004).

NSP2. Proteína codificada pelo segmento 8 e altamente conservada. Esta proteína se expressa em altos níveis em células infectadas e está localizada nos viroplasmas. Sua associação com a NSP5 faz com que essas duas proteínas estejam envolvidas na replicação e “empacotamento” do RNA viral. A NSP2 possui ainda atividade desestabilizadora de hélices de ácidos nucléicos e atividade NTPase (ESTES E KAPIKIAN, 2007; JAYARAM et al., 2004; MERTENS, 2004; TARAPOREWALA et al., 1999).

NSP3. É codificada pelo sétimo segmento do genoma viral e atua na regulação da tradução viral e previne a degradação do mRNA por nucleases celulares (JAYARAM et al., 2004).

NSP4. Codificada pelo segmento 10 é uma glicoproteína transmembrana, de localização no retículo endoplasmático (RE), com 175 aa e massa molecular de 28 KDa, sendo a única proteína não-estrutural que não se liga ao RNA. Tem sido estudada por sua importância na morfogênese e virulência. Na morfogênese do vírus, a NSP4 atua como receptor intracelular na membrana do RE para as partículas incompletas ou *double-layered particles* (DLPs) durante o processo de maturação além de ser um receptor para VP4 (ESTES E KAPIKIAN, 2007; HUANG et al., 2004). Participa também no transporte dessas partículas através do RE e na formação de partículas com envelope transitório. Neste processo atua como um desestabilizante de membrana que permite a remoção do envoltório transitório dessas partículas durante a montagem de partículas maduras (TAYLOR E BELLAMY, 2003). A NSP4 é capaz de ativar os canais dependentes de Ca⁺⁺ no intestino e vem sendo descrita como a primeira enterotoxina viral. Em humanos, a NSP4 foi descrita como sendo capaz de induzir resposta imune celular e humoral

(JOHANSEN et al., 1999). Diferenças entre as sequências de NSP4 de RVs causando infecções sintomáticas e assintomáticas têm sido descritas em alguns estudos. Desta maneira a NSP4 tem sido considerada um determinante de virulência na infecção por RVs (KIRKWOOD et al., 1999; PAGER et al., 2000; ZHANG et al., 1998).

NSP5. Proteína codificada pelo décimo primeiro segmento. Possui atividade autoquinase e em células infectadas apresenta formas hipo e hiper fosforiladas (TARAPOREWALA E PATTON, 2004). Quando a NSP5 é expressa em células não infectadas a NSP2 induz a hiper fosforilação de NSP5, mostrando a interação dessas duas proteínas. Durante o processo de replicação a NSP2, NSP5 e NSP6 estão associadas na formação de viroplasmas (ESTES E KAPIKIAN, 2007; TARAPOREWALA E PATTON, 2004).

NSP6. A proteína NSP6 também é codificada pelo décimo primeiro segmento. É encontrada principalmente nos viroplasmas e interage com a NSP5, evidenciando sua participação nos processos de replicação e encapsidação do vírus. Tem sido proposto que algumas variantes dos grupos A e C de RVs não codifiquem esta proteína (ESTES E KAPIKIAN, 2007; TARAPOREWALA E PATTON, 2004).

4.2.8. Replicação viral

Após a entrada do RVs no organismo, as partículas virais migram para o intestino delgado, penetrando nas células epiteliais maduras que recobrem as microvilosidades por mecanismo ainda não plenamente elucidado (LUNDGREN E SVENSSON, 2003).

Somente partículas com triplo capsídeo conseguem aderir-se às células. A proteína VP4 tem função essencial no ciclo de replicação do vírus, incluindo a ligação ao receptor e a penetração celular. O capsídeo externo está diretamente envolvido no processo infeccioso, atuando na adesão celular, penetração da membrana e entrada na célula.

A infecciosidade dos RVs *in vitro* é aumentada pela presença da enzima proteolítica tripsina, que cliva a proteína VP4, gerando os polipeptídeos VP5* e VP8*, os quais interagem com receptores contendo ácido siálico, domínio VP8*, e com integrinas, VP5*, dando início ao processo de penetração do vírus nos

enterócitos (ESTES E KAPIKIAN, 2007; GUERRERO et al., 2010; HEWISH et al., 2000; ARIAS et al., 2004; SHAW et al., 1996).

Após a internalização, o vírion é transportado ao lisossomo onde ocorre a perda do seu revestimento externo por ação das enzimas lisossomais devido às baixas concentrações de íons cálcio, dando origem a partículas de dupla camada. Estudos têm demonstrado que concentrações apropriadas de íons Ca^{++} são necessárias para se manter a estabilidade da partícula viral, aparentemente pela estabilidade de VP7. A remoção dos íons Ca^{++} dissocia os trímeros de VP7 em monômeros, liberando a VP7 (AOKI et al., 2009).

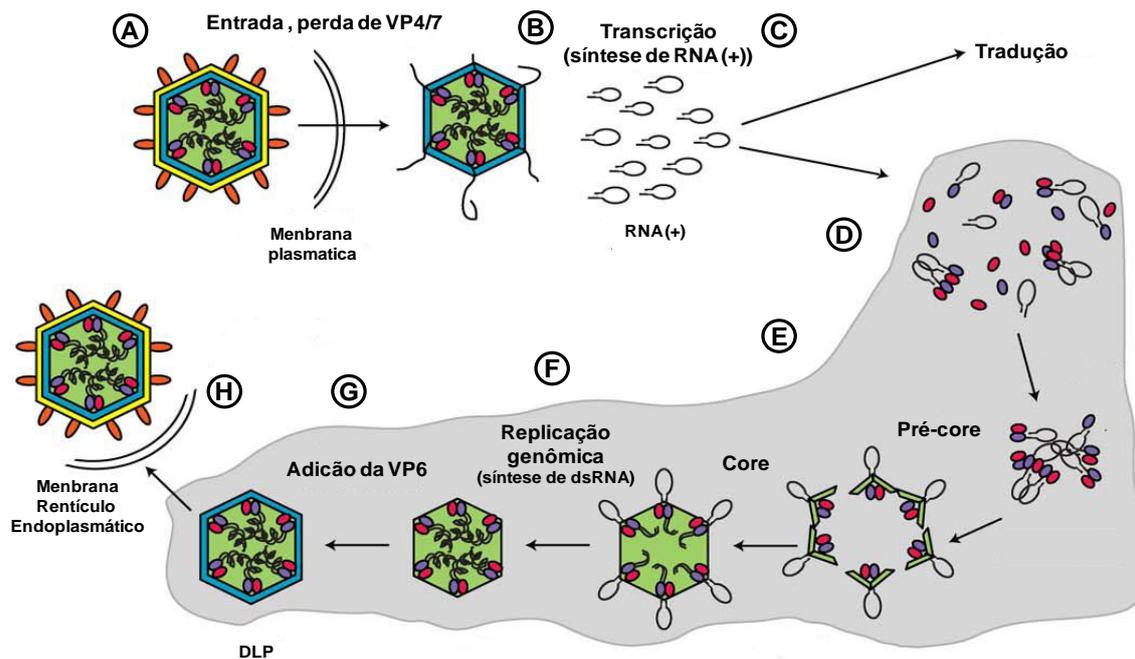
Após a adsorção do vírus à célula hospedeira, sua penetração se dá por passagem direta através da membrana celular e liberação do nucleocapsídeo no citoplasma. No fagossoma ocorre a perda do capsídeo externo (desnudamento) e consequente liberação do seu cerne no citoplasma celular. Em seguida têm início as etapas de transcrição, tradução, replicação e maturação virais. Os RNAs são transcritos pela RNA polimerase RNA dependente e a transcrição é do tipo conservativa. Os RNAs transcritos pela RNA polimerase RNA dependente possuem duas funções: como RNAm a fim de dirigir a tradução das proteínas virais e como moldes para a síntese do RNA de polaridade negativa para a replicação do genoma. Há a produção de RNA (+) a partir do RNA (-) virais. Proteínas recém-sintetizadas e o RNA viral são reunidos no citoplasma da célula infectada, próximo ao RE, em áreas eletrodensas denominadas viroplasmas, que compõem grande quantidade de RNA e proteínas virais (VP1, VP2, VP3 e VP6; NSP2 e NSP5/6) (ESTES E KAPIKIAN, 2007). Então, tais partículas atravessam para o interior do RE por brotamento, por meio da NSP4, que atua como um receptor intracelular. As partículas adquirem um envelope transitório devido à membrana do RE, que posteriormente é perdido e substituído por uma fina camada de proteína que constitui o capsídeo externo. As proteínas do capsídeo externo são sintetizadas nos polirribossomas do RE. As proteínas glicosiladas VP7 (estrutural) e NSP4 (não estrutural) são sintetizadas em associação com o RE. A VP7 forma o capsídeo externo e a NSP4 possui domínio citoplasmático que funciona como receptor da dupla fita da progênie viral (DLPs), interagindo diretamente com a VP6 e VP4 e viabilizando o brotamento das DLPs para o interior do RE. Por fim, partículas virais

maduras, são liberadas por meio da lise celular, de acordo com a Figura 3 (BALL et al., 2005; ESTES E KAPIKIAN, 2007; JAYARAM et al., 2004; RAMIG, 1997).

4.2.9. Mecanismo de evolução genética

Os RVs apresentam elevada variação genética devido seu genoma ser segmentado. Desta maneira, nem sempre se observa o padrão eletroforético descrito nos protótipos virais. Um dos aspectos mais observados nos estudos de diversidade genética entre os RVs tem sido o polimorfismo eletroforético exibido pelos segmentos de dsRNA. A diversidade está relacionada com diferentes mecanismos genéticos como: a) acumulação de mutações pontuais; b) rearranjo genômico, em que dois vírus genotipicamente diferentes, após coinfeção, geram uma nova prole contendo seqüências derivadas dos vírus originais e c) recombinação intramolecular que são inserções, geralmente duplicações, ou deleções, na seqüência de segmentos (ITURRIZA-GÓMARA et al., 2001; RAMIG, 1997).

Substituição de bases nucleotídicas pontuais ocorre, sendo que algumas são conservadas e passadas para a progênie viral. Desta maneira, o acúmulo de mutações poderá desencadear o surgimento de novas linhagens ou sublinhagens genéticas sendo necessária uma análise sistemática de seqüência dos isolados para identificar a frequência dessas mutações nos segmentos de RVs (ITURRIZA-GÓMARA et al., 2001; MAUNULA E VON BONSDORFF, 1998; SONG E HAOZ, 2009).



- A** - Entrada nas células-alvo com perda da VP4 (laranja) e VP7 (amarelo);
- B** - VP1 (roxo) e VP3 (rosa) promovem a síntese de RNA (+) dos onze genes de RVs (elipses pretas);
- C** - Os RNA (+) servirão como molde para tradução bem como molde para a produção de novas fitas de RNA (-);
- D** - As proteínas virais e o RNA (+) se acumulam no viroplasma (cinza);
- E** - VP1, VP3 e o RNA (+) associam-se para formar o pré-core, seguido pela adição da VP2 (verde) para formar o core;
- F** - Replicação dos onze segmentos de dsRNA genômico;
- G** - VP6 (azul) é adicionada para amadurecer o core, formando as DLPs.
- H** - DLPs entram no RE, adquirem a VP4 e VP7 e por brotamento a partícula viral é liberada

Figura 3 - Modelo esquemático do ciclo de replicação dos RVs. As etapas de replicação estão indicadas nas letras.

Fonte: adaptada de Guglielmi et al. (2010).

A permuta de material genético entre vírus de diferentes espécies é chamada de rearranjo, e possibilita a geração de novas variantes de RVs. Acredita-se que a possível transmissão entre espécies seja facilitada pelo convívio do homem com

animais de diferentes espécies, fenômeno que é evidente em países em desenvolvimento. (MARTELLA et al., 2010; MASCARENHAS et al., 2007a; 2007b; GHOSH, et al. 2011).

Vários segmentos genômicos de RVs parecem estar envolvidos como potenciais determinantes de restrição ao hospedeiro e virulência. Contudo, o entendimento da base molecular na restrição das espécies e a virulência dos RVs, são ainda dificultados pela quantidade insignificante de dados de sequenciamento do genoma completo de amostras de RVs (MATTHIJNSSENS et al., 2006). Contudo, estudos de análise filogenética dos genes estruturais e não estruturais já realizados tem revelado um consistente padrão evolucionário entre RVs de origem humana e animal (ABE et al., 2011; ARORA E CHITAMBAR, 2011; BÁNYAI et al., 2011; MASCARENHAS et al., 2006; 2007b)

4.2.10. Transmissão

Altas concentrações de RVs são excretadas durante a evacuação, com eliminação de cerca de um trilhão de partículas virais por milímetro cúbico de espécime fecal, sendo que são necessários apenas dez vírions para desencadear uma infecção no homem (ESTES E KAPIKIAN, 2007). O período de incubação varia de um a três dias, e o pico máximo de excreção ocorre entre o terceiro e o quarto dias após o aparecimento dos primeiros sinais e sintomas. Tais parâmetros, associados à sua estabilidade físico-química, são os determinantes da elevada transmissibilidade deste vírus, principalmente onde há frequente contato pessoa a pessoa como creches e enfermarias pediátricas (ESTES E KAPIKIAN, 2007; MÜLLER E JOHNE, 2007).

A transmissão deste agente viral é basicamente fecal-oral; a água e os alimentos contaminados exercem importante papel na disseminação dos RVs, contudo, outras vias têm sido estudadas, como o trato respiratório e a contaminação por meio de fômites como possíveis vias de infecção (COOK et al., 1990; ESTES E KAPIKIAN, 2007; SATTAR et al., 1994; ZHENG et al., 1991). Azevedo et al. (2005), em estudo conduzido com suínos, inocularam por via intranasal o RVs humano, havendo o desenvolvimento de diarreia nos animais.

A transmissão entre espécies tem sido registrada como sendo mais provável de ocorrer nos países em desenvolvimento, onde há influência das condições insalubres de higiene e do maior convívio dos homens com animais, principalmente bovino, suíno e aves (JAIN et al., 2001; MARTELLA et al., 2006; TEODOROFF et al., 2005).

Em Belém, em um estudo conduzido com espécimes fecais de neonatos e crianças com diarreia foi observado similaridade de RVs com genes provenientes de amostras de origem suína (MASCARENHAS et al., 2007a; 2007b).

4.2.11. Patogenia

Embora se tenha amplo conhecimento sobre a estrutura dos RVs e seus componentes, o mecanismo exato da entrada na célula ainda é pouco compreendido. A patogênese dos RVs é baseada em modelos animais, e ainda não está totalmente esclarecida, porém sabe-se que os RVs infectam os enterócitos diferenciados maduros do intestino delgado e por mecanismos desconhecidos migram para o trato gastrointestinal causando viremia (CRAWFORD et al., 2006; MATTHEW E VENKATARAM, 2010).

O efeito deletério viral é de natureza lítica, resultando num quadro diarréico de natureza osmótica devido ao efluxo de líquidos (KAPIKIAN et al., 2001). Existe ainda um componente de má-absorção da diarreia que parece estar relacionado ao dano primário do epitélio intestinal pela infecção viral e pela ação da enterotoxina viral NSP4 secretada. Tais efeitos são observados no epitélio e podem ser expressos pelo comprometimento da “bomba” de Ca^{2+} nas células secretoras da cripta (BALL et al., 1996; ESTES E KAPIKIAN, 2007; LUNDGREN E SVENSSON, 2003).

Aoki et al. (2009), demonstraram que o balanço eletrolítico de íons Ca^{2+} são necessários para manter a estabilidade da partícula viral e acredita-se que seja devido a estabilidade de VP7. A remoção destes íons dissocia os trímeros de VP7, liberando a VP7 do virion e iniciando a penetração na célula.

Crawford et al. (2006), em estudo com modelo neonatal utilizando camundongos jovens na infecção por RVs, detectou a disseminação e aspectos histopatológicos das infecções por RVs nos órgãos extraintestinais como estômago, intestino, fígado, pulmão, rim, pâncreas, timo e bexiga. Deste modo a infecção por

RVs pode incluir não somente a gastroenterite, mas também a viremia, indicando que os RVs poderiam causar uma doença sistêmica mais ampla em diferentes órgãos.

Um novo sistema *in vitro* foi estabelecido para o cultivo isolado de pequenas vilosidades intestinais de camundongos recém-nascidos apresentando-se como perspectiva para um modelo útil e eficaz para estudos de infecção por RVs (GUERRERO et al., 2010).

4.2.12. Manifestações clínicas

A maior incidência de infecção sintomática por RVs ocorre principalmente na faixa etária de 6 a 24 meses, e estudos demonstram que ele causa 12-71% dos episódios de gastroenterites graves nessa idade (O'RYAN et al., 2001). Adultos também podem ser infectados, embora a doença tenda a ser mais moderada (ROMERO et al., 2007).

As infecções por RVs podem ser assintomáticas ou se expressarem como gastroenterite moderada ou grave. O período de incubação é curto (um a três dias) e as manifestações clínicas mais frequentes são a tríade clássica, diarreia, febre e vômitos. A falta de intervenção terapêutica precoce pode culminar com desidratação e óbito. Os neonatos e as crianças com até quatro meses de idade são os que mais apresentam infecções assintomáticas, provavelmente devido à proteção conferida pelos anticorpos maternos (LINHARES et al., 1989; KAPIKIAN et al., 2001). A febre é registrada em mais da metade dos casos, com temperatura axilar não raro $\geq 39^{\circ}\text{C}$. Eventualmente, o quadro clínico envolve outros sintomas tais como náuseas, inapetência e dor abdominal. Outras condições clínicas atípicas podem ocorrer, incluindo as diarreias sanguinolentas. Também tem sido registrado o comprometimento respiratório, evoluindo com otite média e broncopneumonia, registrando-se detecção dos RVs, a partir das secreções respiratórias (ZAHN E MARSHALL, 2006).

Relatos associam os RVs a processos mórbidos atípicos, dentre estes, encefalites, síndrome de Reye, intussuscepção, doença de Kawasaki, exantema súbito, hepatite transitória, morte súbita e enterocolite necrotizante (KAPIKIAN et al., 2001; OISHI et al., 1991; SAITOH et al., 1981; YOLKEN E MURPHY, 1982).

4.2.13. Imunização

Duas diferentes vacinas contra RVs vêm mostrando eficácia no cenário atual, uma preparação pentavalente de origem bovino-humana, denominada Rotateq® (Merck, West Point, Pennsylvania) e a outra vacina é a Rotarix®, representada por preparação monovalente, atenuada, de origem humana (especificidade P[8]G1), produzida pela GlaxoSmithKline Biologicals (Rixensart, Bélgica).

A vacina Rotarix® foi introduzida no calendário do Programa Nacional de Imunizações desde 2006, sendo administrada em duas doses pela via oral, aos dois e aos quatro meses de idade (BRASIL, 2006). Esta vacina apresenta proteção tanto homóloga quanto heteróloga, induzindo redução significativa na frequência de detecção de RVs em crianças com gastroenterite (GURGEL et al., 2008; LINHARES et al., 2006; SALVADOR et al., 2011).

No Brasil, a vacina Rotarix® tem apresentado proteção de aproximadamente 70% para todas as diarreias por RVs, de 86% a 98% para as formas graves e de 80% a 95%, para hospitalização por diarreia associada aos RVs, reforçando a eficácia da vacina o que influi diretamente nos indicadores de morbimortalidade por RVs (GILIO, 2009).

O Ministério da Saúde estabeleceu o indicador de cobertura vacinal para a Rotarix® em 90%. Dados do Ministério da Saúde revelam que, em 2009, da população menor de um ano, que totalizava 6.380.189 crianças, a vacina contra o RVs foi devidamente aplicada em 5.238.685 infantes, o que traduz uma cobertura vacinal de 82% (BRASIL, 2009).

O monitoramento constante das cepas de RVs circulantes é de extrema importância, uma vez que genótipos emergentes podem surgir como mecanismo de escape vacinal e estudos são importantes para melhor compreensão da dinâmica viral (MORILLO et al., 2010).

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. ASPECTOS ÉTICOS E DE BIOSSEGURANÇA

O estudo ocasionou riscos ou prejuízo mínimo para as crianças e neonatos e seus responsáveis. A presente investigação foi submetida e avaliada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Evandro Chagas em respeito às normas nacionais e internacionais que regulamentam tal atividade, sendo aprovado com o protocolo CEP/IEC – N° 004/2011 (**ANEXO 1**).

O Termo de consentimento livre e esclarecido não foi aplicado no presente estudo, devido o mesmo ser formado por projetos anteriormente desenvolvidos no IEC, portanto, tal termo foi aplicado no seu período de realização.

Em relação aos aspectos de biossegurança, no decorrer dos procedimentos foram utilizados equipamentos de proteção individual (EPIs) e todo material potencialmente contaminado foi manipulado em laboratório de segurança NB2 com o uso de cabine de contenção biológica nível 2.

5.2. PACIENTES E ESPÉCIMES CLÍNICOS

Os espécimes fecais analisados no estudo foram oriundos de projetos de pesquisa em gastroenterites virais conduzidos no Instituto Evandro Chagas (Estudo com neonatos; Hospital-Sentinela e Rede de Vigilância), descritos resumidamente na Tabela 4. A inclusão do espécime consistiu de: amostra positiva para RVs que apresentasse características genéticas com amostra de RVs animal e estar sob acondicionamento em freezer -20°C. As amostras que não satisfizessem esses critérios, foram excluídas do estudo.

Os oito espécimes clínicos selecionados para este estudo foram provenientes de neonato e crianças, que apresentaram os genes VP7 (amostra RV10109), VP4 e NSP4 (amostras HST327; HSP180; HSP034 e NB150) ou eletroferotipo semelhante à de RVs animal (amostra NSC206; NSC209; NSC212) de acordo com o demonstrado na Figura 4.

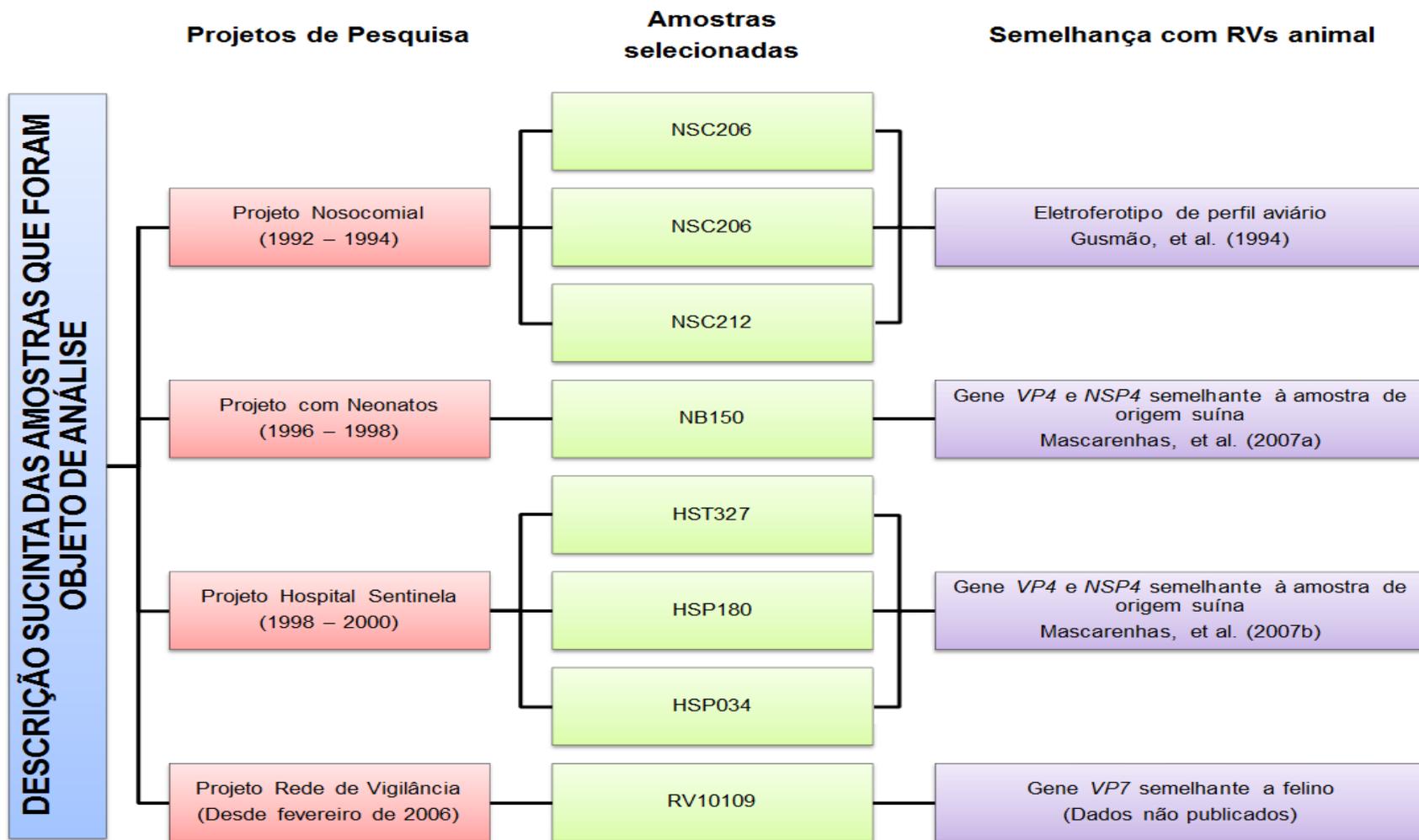


Figura 4 – Descrição sucinta das amostras que foram objeto de análise. Os espécimes clínicos constituíram-se de amostras fecais de crianças e neonato provenientes de projetos de pesquisa em gastroenterites virais, conduzidos em Belém, Pará, no período de 1994 a 2006 de acordo com o demonstrado no organograma.

a. Estudo com neonatos

Essa investigação avaliou as características epidemiológicas das infecções por RVs envolvendo recém-nascidos hospitalizados em Belém, Pará. Foi realizada entre maio de 1994 a maio de 1998 e incluiu 437 neonatos com até 28 dias de idade. Um total de 614 espécimes fecais foi coletado, dos quais 51 foram associados à infecção por RVs (Linhares et al., 2002).

b. Estudo de vigilância da doença por RVs em Belém, Pará, antes e após a implementação de vacinas (Estudo Hospital-Sentinela)

Esse estudo objetivou medir a diversidade antigênica das amostras circulantes de RVs e o impacto da doença causada por esses agentes em Belém, Pará. Foi conduzido no período de maio de 1998 a maio de 2000, envolvendo crianças com diarreia aguda na faixa etária de 0 a 3 anos, atendidas a nível ambulatorial ou hospitalar em Belém, Pará. Das 834 amostras coletadas, 281 foram positivas para RVs por ELISA (MASCARENHAS et al., 2006; 2007).

c. Estudo de vigilância epidemiológica das gastroenterites por RVs no Brasil: determinação do impacto da doença (Rede Oficial de Vigilância de Rotavírus)

Este estudo teve como objetivo estabelecer uma rede nacional de vigilância epidemiológica das gastroenterites por RVs, a fim de se definir o impacto da doença causada por esses patógenos no país. Foi iniciada em fevereiro de 2006, incluindo cinco municípios, um de cada região do Brasil, sendo que na Região norte foi selecionado o município de Marituba, no estado do Pará. Até o momento de seleção de amostras para o presente estudo, 370 espécimes fecais foram coletados, 216 foram positivas para RVs.

Tabela 4 - Características dos estudos sobre RVs realizados em Belém, Pará, no período de 1992 a 2006, cujos espécimes fecais foram utilizados nesta pesquisa.

Estudo, título abreviado	Características do estudo	Período	Faixa etária	Positivo para RV/amostras coletadas	Amostras que apresentaram semelhança com RV animal	Características não humana em estudos anteriores	Referência
A, Nosocomial/infecção em comunidade	Hospitalar	1992 - 1994	0-5 anos	48/290 (16%)	NSC206 ⁺⁺ NSC209 ⁺⁺ NSC212 ⁺⁺	Eletroferotipo de perfil aviário	Gusmão et al. (1994)
B, Projeto com Neonatos	Hospitalar	1996 - 1998	< 28 dias	51/614 (8%)	NB150 ⁺⁺	VP4 e NSP4 origem suína	Mascarenhas, et al. (2007a)
C, Projeto Hospital Sentinela	Hospitalar / Posto de Saúde	1998 - 2000	0-3 anos	281/834 (34%)	HST327 ⁺ HSP180 ⁺ HSP034 ⁺	VP4 e NSP4 origem suína	Mascarenhas, et al. (2007b)
D, Projeto Rede de Vigilância	Comunitário	Desde fevereiro de 2006	0-5 anos	66/370 (18%)	RV10109 ⁺	VP7 origem felina	(Dados não publicados)

⁺ Community acquired diarrhea

⁺⁺ Nosocomial diarrhea

5.3. SUSPENSÕES FECAIS

As suspensões fecais foram preparadas a 10% em tampão Tris-Ca⁺⁺ 0,01M pH 7,2, visando à extração do RNA viral (BOOM et al., 1990). Em seguida foram homogeneizadas e centrifugadas a 3000 rpm por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi coletado e estocado a -20°C.

5.4. EXTRAÇÃO DO GENOMA VIRAL

O genoma viral foi extraído a partir de 400 µL de suspensões fecais de acordo com o método descrito por Boom et al. (1990). Para cada amostra foi identificado um microtubo cônico com capacidade de 1,5 mL e adicionado 20 µL de proteinase K (20 mg/mL) e 800 µL de Tampão L6 e incubados em banho-maria a 56°C por 10 minutos. Em seguida se adicionou 200 µL de etanol absoluto gelado e 20 µL de sílica e se homogeneizou em agitador orbital.

O sobrenadante foi submetido a sucessivas lavagens com 500 µL de Tampão L2, 500 µL de Etanol 70% e 500 µL de acetona com posterior sedimentação em

banho-maria 56°C por 15 minutos, com a tampa do banho-maria e dos tubos abertas. Após a sedimentação se adicionou 60 µL de água livre de Rnase, levado ao banho-maria a 56°C por 15 minutos e posteriormente centrifuga a 14.000 rpm por 4 minutos. Em seguida foi coletado cuidadosamente o sobrenadante (30 a 40 µL) e transferido para um tubo previamente identificado e armazenado à -20°C.

5.5. REAÇÃO EM CADEIA MEDIADA PELA POLIMERASE PRECEDIDA DE TRANSCRIÇÃO REVERSA (RT-PCR)

A RT-PCR foi realizada, em duas etapas usando-se 2,5 µL do dsRNA. A primeira etapa consistiu na obtenção do DNA complementar (cDNA) por meio de transcrição reversa, e a segunda etapa consistiu na amplificação pela reação em cadeia mediada pela polimerase (PCR).

Para a obtenção do DNA complementar (cDNA), 2 µL de dsRNA extraído, foi acrescido do par de iniciadores específico para o gene analisado, segundo descrito na Tabela 5, e desnaturado a 97°C em termociclador por 7 minutos, seguido de banho de gelo (0°C) por 5 minutos. Em seguida foi adicionada uma mistura, para à obtenção do cDNA por meio de transcrição reversa, durante 1 hora a 42°C (Tabela 6).

Tabela 5 - Sequência dos iniciadores utilizados na RT-PCR e no sequenciamento de nucleotídeos dos genes que codificam as proteínas estruturais e não-estruturais de RVs.

Iniciador	Gene	Sequencia	Amplicon*
VP1F(+) ¹	VP1	5'-GGC TAT TAA AGC TGT ACA ATG GG-3'	686
VP1IR(-) ¹		5'-TAA TCC TCA TGA GAA AAC ACT GAC-3'	
VP2F(+) ¹	VP2	5'-GGC TAT TAA AGG CTC AAT GGC G-3'	686
VP2IR(-) ¹		5'-CTT CAT CTT GAA ATA TAG CAA TCA C-3'	
VP3F(+) ¹	VP3	5'-GGC TAT TAA AGC AGT ACC AGT AG-3'	702
VP3IR(-) ¹		5'-GTA AAC ATA GAT TCA TTA CGC GGA CC-3'	
Con4con3(+) ²	VP4	5'-TGG CTT CGC CAT TTT ATA GAC A-3'	876
Con4con2(-) ²		5'-ATT TCG GAC CAT TTA TAA CC-3'	
VP6- F(+) ³	VP6	5'-GAC GGV GCR ACT ACA TGG T-3'	376
VP6-R(-) ³		5'-GTC CAA TTC ATN CCT GGT GG-3'	
9con1(+) ⁴	VP7	5'-TAT TAC ATT GCA TTT CTT TCC-3'	904
9con2(-) ⁴		5'-GTA TAA AAT ACT TGC CAC CA-3'	
Beg9(+) ⁵		5'GGC TTT AAA AGA GAG AAT TTC CGT CTG G-3'	
End9(-) ⁵		5'-GGT CAC ATC ATA CAA TTC TAA TCT AAG-3'	
NSP1F(+) ⁶	NSP1	5'-GGG CTT TTT TTT GAA AAG TC-3'	1565
NSP1R(-) ⁶		5'-GGT CAC ATT TTA TGC TGC CTA-3'	
K-NSP2F ⁷	NSP2	5'-GGC TTT TAA AGC GTC TCA GTC-3'	1038
K-NSP2R ⁷		5'-GGT CAC ATA AGC GCT TTC TAT-3'	
GEN-NSP3F(+) ⁸	NSP3	5'-GGC TTT TAA TGC TTT TCA GTG-3'	1062
GEN-NSP3R(-) ⁸		5'-ACA TAA CGC CCC TAT AGC-3'	
JRG30 F(+) ⁹	NSP4	5'-GGC TTT TAA AAG TTC TGT T-3'	738
JRG31R(-) ⁹		5'-ACC ATT CCT TCC ATT AAC-3'	
GEN-NSP5F(+) ⁸	NSP5/6	5'-GGC TTT TAA AGC GCT ACA G-3'	664
GEN-NSP5R(-) ⁸		5'-GGT CAC AAA ACG GGA GT-3'	

* amplicon em pares de base (pb)

Fonte: ¹Varghese et al. (2006); ²Gentsch et al. (1992); ³Iturriza-Gómara et al. (2002); ⁴Das et al. (1994); ⁵Gouvea et al. (1990); ⁶Nakagomi e Kaga, (1995); ⁷Mijatovic-Rustempasic et al. (2011); ⁸Matthijnsens et al. (2006); ⁹Cunliffe et al. (1997).

Tabela 6 - Reagentes utilizados para uma amostra, na obtenção do cDNA por meio da transcrição reversa, na reação de RT-PCR.

Reagentes	Concentração	Volume para reação (µL)
H ₂ O livre de DNAase / RNAase	--	17,25
dNTP*	25 mM	1
Tampão para PCR	10 X	2,5
MgCl ₂	50 mM	1
Par de iniciador	20 mM	2
RT**	20 U/µL	0,25

* Mistura dos quatro desoxirribonucleotídeos trifosfato: dATP, dCTP, dGTP e dTTP.

** II RNAse Reverse Transcriptase 10000U, 20 U/µL

Após a obtenção do cDNA, foi realizada a reação para amplificação dos genes *VP7*, *VP4*, *VP6*, *VP1*, *VP2*, *VP3*, *NSP1*, *NSP2*, *NSP3*, *NSP4* e *NSP5/6* pela PCR, adicionando ao cDNA obtido na primeira etapa uma mistura de reagentes (Tabela 7) nas seguintes condições: 1 ciclo de 94°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 45°C por 2 minutos e 72°C por 2 minutos e um ciclo de 72°C por 10 minutos de extensão final. Para os genes *VP4*, *VP6*, *VP7* e *NSP4*: 1 ciclo de 94°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 42°C por 2 minutos e 72°C por 2 minutos e um ciclo de 72°C por 10. A RT-PCR foi padronizada para os genes *VP1*, *VP2*, *VP3*, *NSP1*, *NSP2*, *NSP3* e *NSP5/6*, sendo que para os genes *VP7*, *VP4*, *VP6* e *NSP4* a técnica já estava estabelecida e em uso no Laboratório de Rotavírus do Instituto Evandro Chagas.

Tabela 7 - Reagentes utilizados para uma amostra, para a amplificação pela PCR, da RT-PCR.

Reagentes	Concentração	Volume para	Volume para
		reação (µL) NSP1, 2, 3 e 5 VP1, 2 e 3	reação (µL) VP4, 6 e 7 NSP4
H ₂ O livre de DNAase / RNase	---	18,2	20,25
dNTP	25 mM	3	1
Tampão para	PCR 10X	2,5	2,5
MgCl ₂	50 mM	1	1
Taq DNA Polimerase	5 U/µL	0,3	0,25

Os amplicons obtidos para os genes: *VP1* (686 pb), *VP2* (686 pb), *VP3* (702 pb), *VP4* (875 pb), *VP6* (379 pb), *VP7* (904 pb e 1062 pb), *NSP1* (1565 pb), *NSP3* (1062 pb), *NSP4* (738 pb) e *NSP5/6* (664 pb) foram submetidos ao sequenciamento de nucleotídeos.

5.6. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Os produtos obtidos na RT-PCR foram aplicados juntamente com o azul de bromofenol (corante), além do marcador de peso molecular de 123 pb. Os mesmos foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,5% em tampão tris-borato-EDTA (TBE) 1X, a 120 Volts (V) e 400 milli-Ampéres (mA) por 30 minutos. Posteriormente, o gel foi corado com brometo de etídio por 20 minutos em agitador orbital, lavado em água destilada, e visualizado e fotografado em aparelho para foto documentação de gel.

5.7. PURIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO cDNA

Os amplicons obtidos foram purificados utilizando-se dois kits disponíveis comercialmente: 1) Diretamente do produto da PCR, com o kit QIAQuick PCR purification; 2) A partir da banda de interesse visualizada no gel, a qual foi cortada e purificada, com o kit QIAQuick gel extraction.

A quantificação do DNA, expressa em nanogramas (ng), foi realizada com o marcador de peso molecular Low DNA Mass Ladder, servindo de parâmetro para a reação de sequenciamento.

5.8. SEQUENCIAMENTO DE NUCLEOTÍDEOS E ANÁLISE FILOGENÉTICA

A reação de sequenciamento foi conduzida segundo o protocolo descrito pelo fabricante do *kit Big Dye Terminator*. As sequências obtidas foram alinhadas e editadas utilizando o programa BioEdit (Version 7.0.5.2) (HALL, 1999) e comparadas com sequências de outras amostras de RVs disponíveis no banco de genes “Genbank” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), a partir do programa BLAST. Os filogramas foram construídos empregando-se o programa MEGA v. 7.0.5.2., pelo método de “Neighbor-Joining” (SAITOU e NEI, 1987), baseado nos parâmetros de Kimura-2-parametros (K2p) (Kimura, 1980), utilizando o teste de confiabilidade não paramétrico de *bootstrap*.

As amostras do presente estudo foram analisadas para o gene *VP7* de RVs, utilizando como parâmetro a classificação para G1, G2, G3 e G4 proposta por Jin et al. (1996), Page e Steele (2004), Bok et al. (2002) e Matthijnsens et al. (2008a), respectivamente. Para o gene *VP4* foram considerados os genótipos P[4], P[6] e P[9] e utilizou-se como parâmetro as classificações propostas por Arista et al. (2005), Martella et al. (2006) e Matthijnsens et al. (2008a), respectivamente. Os demais genes foram agrupados em genótipos conforme os valores de *cut-off* descrito na classificação proposta por Matthijnsens et al. (2008a).

6. RESULTADOS

No presente estudo foram analisadas oito amostras de RVs não usuais provenientes de neonato e crianças com diarreia e sugestivas de transmissão entre espécies em estudos anteriores. Todos os espécimes fecais analisados foram submetidos à extração dos RNAs virais e a amplificação parcial dos genes estruturais e não estruturais de RVs, de acordo com a Tabela 8.

Tabela 8 – Constelação de genótipos analisados neste estudo. O perfil genético dos genes está representado pelos códigos de cores: Humano (branco); Suíno (azul); Felino (roxo); Bovino (laranja); Origem não determinada (marrom); Sequencia não obtida devido esgotamento do espécime fecal (x). Foi utilizado para orientação gênica na tabela o protótipo de origem humana DS-1 descrito por Matthijssens et al. (2008a).

	VP7	VP4	VP6	VP1	VP2	VP3	NSP1	NSP2	NSP3	NSP4	NSP5/6	Genótipo
DS-1	G2	P[4]	I2	R2	C2	M2	A2	N2	T2	E2	H2	G2-P[4]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2
NSC206	G2	x	x	R2	x	M2	A2	N2	T2	x	H2	G2-R2-M2-A2-N2-T2-H2
NSC209	G2	P[4]	x	R2	C2	M2	A2	N2	T2	x	H2	G2-P[4]-R2-C2-M2-A2-N2-T2-H2
NSC212	G2	P[4]	x	X	x	x	x	N2	T2	x	H2	G2-P[4]-N2-T2-H2
NB150	G1 + G4	P[6]	I1	R1	C1	M1	A1	x	T1	E1	H1	G1/G4-P[6]-I1-R1-C1- M1- A1-T1-E1-H1
HSP034	G2	P[6]	x	R2	C2	M2	A2	x	T2	E1	H2	G2-P[6]-R2-C2-M2-A2-T2-E1-H2
HSP180	G4	P[6]	I1	R1	C1	M1	A8	N1	T7	E1	H1	G4-P[6]-I1-R1-C1-M1-A8-N1-T7-E1-H1
HST327	G4	P[6]	x	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1	G4-P[6]-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1
RV10109	G3	P[9]	x	R2	C2	M2	A3	N1	T3	E3	H3	G3-P[9]-R2-C2-M2-A3-N1-T3-E3-H3

Não foi possível a realização com sucesso da análise filogenética em 17 sequências (Tabela 8), as quais foram insistentemente repetidas, porém, devido ao esgotamento dos espécimes fecais, visto se tratar de amostras já trabalhadas em projetos anteriores, não foi possível prosseguir com as análises.

No presente estudo foi verificada a ocorrência de eventos de rearranjo entre genes provenientes de animais em 5/8 (62,5%) das amostras, devido a alta similaridades das amostras de origem humana do presente estudo quando comparada com amostras de outras espécies.

A Tabela 8 apresenta resumidamente a relação genética das amostras analisadas, demonstrando que as amostras NSC 206, 209 e 212 foram incluídas na presente análise por apresentarem uma distribuição atípica dos *clusters* à eletroforese em gel de poliacrilamida, configurando-se perfil similar ao descrito para RVs aviários. Contudo, as mesmas não evidenciaram genes sugestivos de eventuais permutas envolvendo RVs de origem animal quando analisados geneticamente os 11 genes de RVs.

Por outro lado, a análise para os outros RVs: NB150, HSP034, HSP180, HST327 e RV10109 demonstra que: a) há uma amostra (RV10109) sugerindo origem felina com a detecção do genotipo P[9]; b) duas (NB150 e HST327) que apresentam algumas características gênicas de vírus de suínos; c) outra (HSP180) aparentemente com genes oriundos de amostras bovina e suína; e d) uma quinta (HSP034) comportando algumas características gênicas relacionadas aos RVs suínos.

Na análise para os genes estruturais e não estruturais de RVs terá ênfase os genes que no presente estudo, evidenciaram similaridade com genes de origem animal.

As sequências parciais de nucleotídeos determinadas neste estudo foram depositados na base de dados *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e atribuído os números de acesso JQ715624 - JQ715680.

6.1. GENES ESTRUTURAIS:

Para o gene *VP7* foi possível a realização do sequenciamento de nucleotídeos e a análise filogenética em 100% (8/8) das amostras analisadas para RVs, ocorrendo o agrupamento em quatro genótipos distintos.

A Figura 5 demonstra que a amostra RV10109 de genótipo G3, agrupou com aquelas de origem humana e felina, apresentando similaridade superior a 91%, enquanto que para o genótipo G4, a HSP180 ficou reunida com amostra de origem suína (ArgP28) na Linhagem VII, Sub-linhagem VIIc.

Foi realizado para o gene *VP4* o sequenciamento de nucleotídeos em 87,5% (7/8) das amostras, com duas amostras agrupando no genótipo P[4], quatro no P[6] e uma no P[9]. As amostras NB150, HSP034 e HSP180 analisadas para o genótipo P[6], ficaram reunidas na linhagem I, sem agrupar especificamente em nenhuma das sub-linhagens propostas (Representado na Figura 6 por I), sendo que a maior similaridade (maior que 91,6%) foi com o representante da sub-linhagem Ib de origem suína 221/04. A HST327, não pôde ser classificada em nenhuma linhagem de P[6], sendo mais similar (82%) a amostra de origem suína 221/04 (Figura 6).

Para o gene *VP6*, as amostras analisadas agruparam em dois grupos distintos no genótipo I1, apresentando cada grupo *bootstrap* de 100%. O primeiro grupo foi formado pelos protótipos RV3 e ST3 com as amostras rj7335 do Rio de Janeiro e a NB150 e o segundo grupo pelas amostras AL28, rj31022/1 e HSP180 somente com representantes de origem humana (Figura 7).

No gene *VP1* foi possível analisar 87,5% (7/8) das amostras, com a identificação dos genótipos R1 em três delas e R2 nas quatro demais, como demonstrado na Figura 8. Para o genótipo R1 da *VP1* as amostras HST327 e NB150 agruparam com representantes de origem suína. A RV10109 agrupou no genótipo R2, com os protótipos 30/96 (origem de coelho), BA222 (origem felina) e MG6 (origem humana) apresentando similaridades nucleotídicas de 90,4%, 90,4% e 91,9%, respectivamente (Figura 8).

Foram identificados dois genótipos para o gene *VP2*, dentre as seis amostras sequenciadas (6/8; 75%): genótipo C1 e C2 com três amostras em cada. No genótipo C1 da *VP2*, a HST327 e HSP180 apresentaram similaridade nucleotídica maior que 90,7% com a amostra de rearranjo bovino-suíno KJ75. O genótipo C2

teve como representante a amostra RV10109, que agrupou (*bootstrap* de 100%) com o protótipo de origem felina BA222 apresentando similaridade de 98,8% (Figura 9).

Das amostras do presente estudo, em 87,5% (7/8), foi possível realizar as análises para o gene *VP3*, sendo que três agruparam no genótipo M1 e quatro no M2. No genótipo M1 deste gene, a amostra HSP180 apresentou similaridade nucleotídica de 94,1% com a EC2184 (origem humana-suína) e 91,8% com o protótipo OSU (origem suína). Ainda no genótipo M1 a NB150 agrupou em um ramo isolado, apresentando similaridade de 89,8% com o protótipo de origem humana (Wa), 89,2% com o de origem suína (Gottfried) e 85,7% com a amostra HP140 de origem suína. Diferentemente, a RV10109 formou um grupo coeso no genótipo M2, com representantes de origem humana (PAH136), felina (BA222) e bovina (WC3) com similaridades de 97,1%, 92,3% e 85,5%, respectivamente (Figura 10).

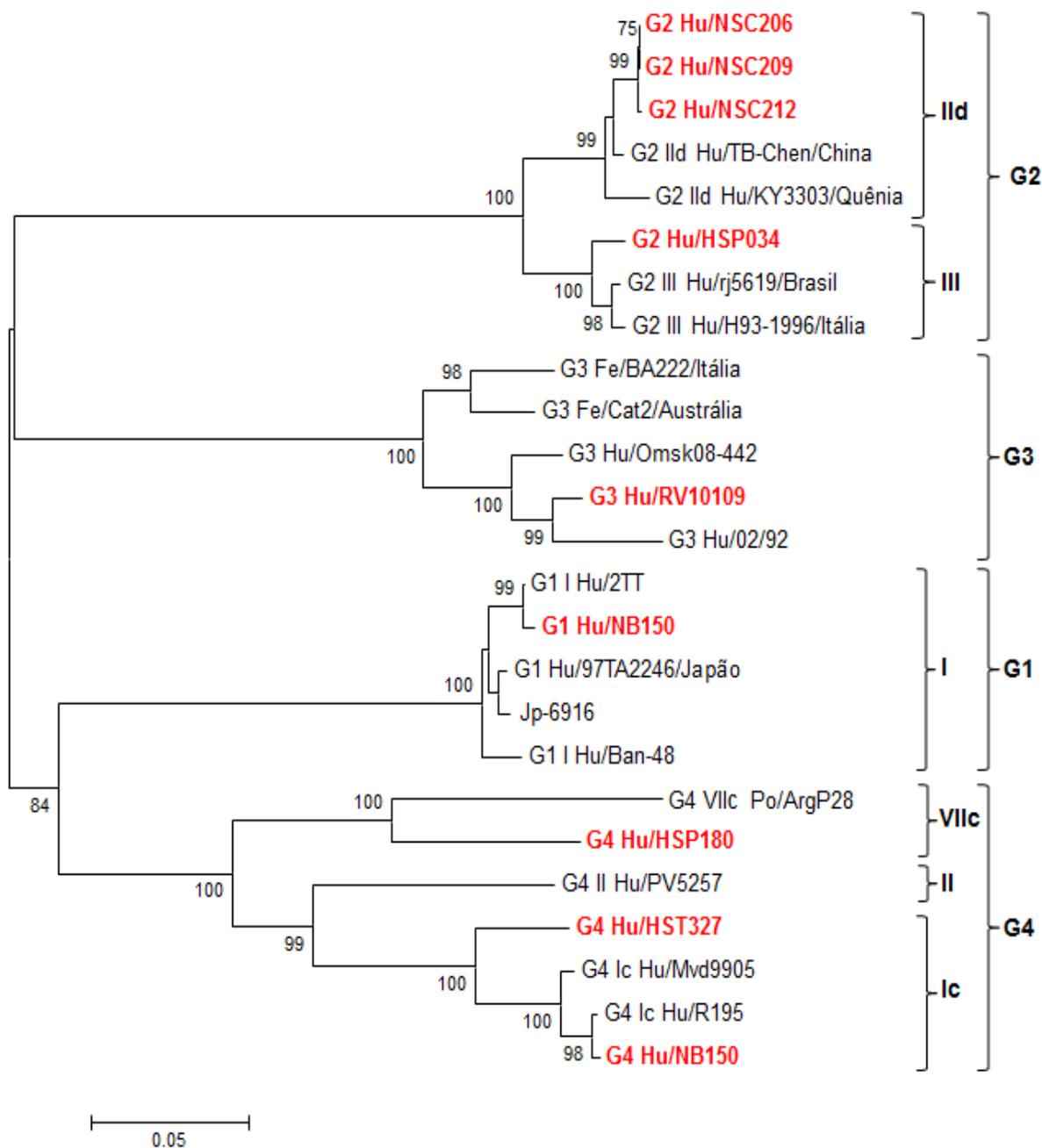


Figura 5 - Filograma representando a classificação das amostras do estudo em diferentes genótipos G de VP7¹ (808 pb). Foi utilizado o método de Neighbor-Joining² com o modelo de reconstrução filogenética K2p. Os valores de *Bootstrap* (2.000 réplicas) estão indicados nos nós da árvore.

¹ JIN et al., 1996; PAGE E STEELE, 2004; BOK et al., 2002; MATTHIJNSSENS et al., 2008a; ² SAITOU E NEI, 1987

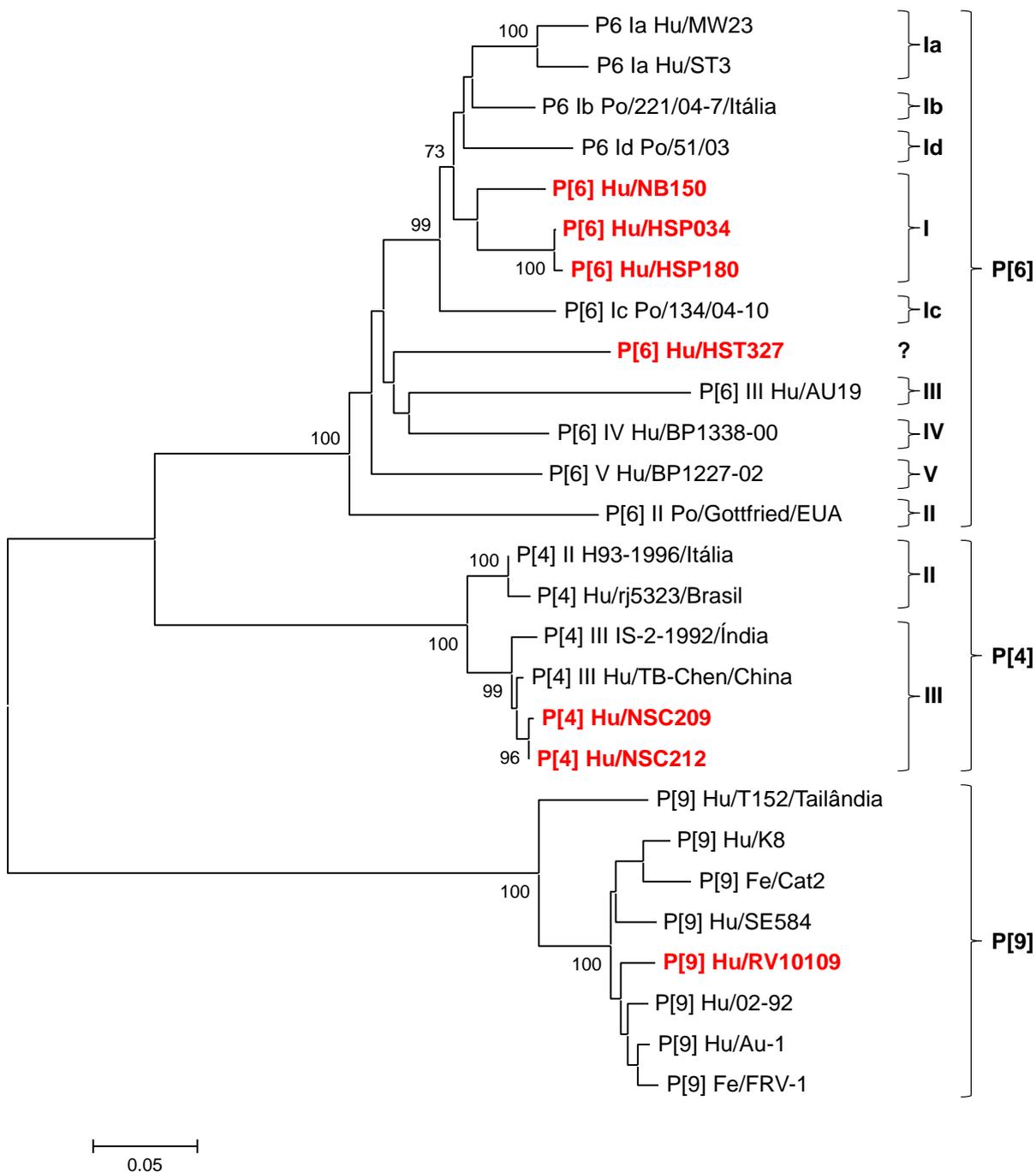


Figura 6 – Filograma representando a classificação das amostras do estudo em diferentes genótipos P[] de VP4¹ (824 pb). Foi utilizado o método de Neighbor-Joining² com o modelo de reconstrução filogenética K2p. Os valores de *Bootstrap* (2.000 réplicas) estão indicados nos nós da árvore.

? - Amostra que não agrupou em nenhuma linhagem específica

I? - Amostra que não agrupou em nenhuma sub-linhagem específica da linhagem I

¹ ARISTA et al., 2005; MARTELLA et al., 2006a; MATTHIJNSSENS et al., 2008a; ² SAITOU E NEI, 1987.

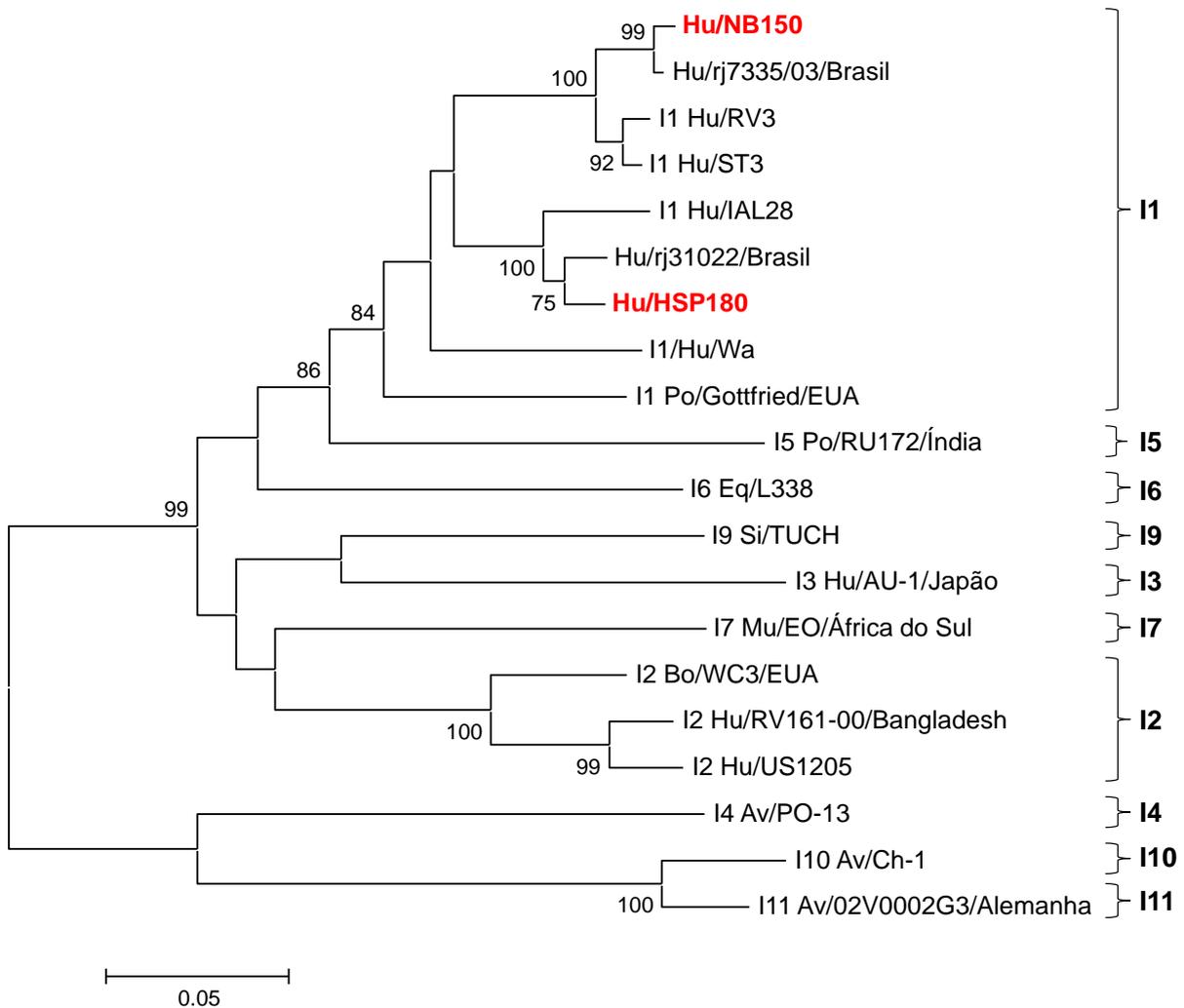


Figura 7 – Filograma representando a classificação das amostras do estudo em diferentes genótipos I de VP6¹ (332 pb). Foi utilizado o método de Neighbor-Joining² com o modelo de reconstrução filogenética K2p. Os valores de *Bootstrap* (2.000 réplicas) estão indicados nos nós da árvore.

¹ MATTHIJNSSENS et al., 2008a; ² SAITOU E NEI, 1987.

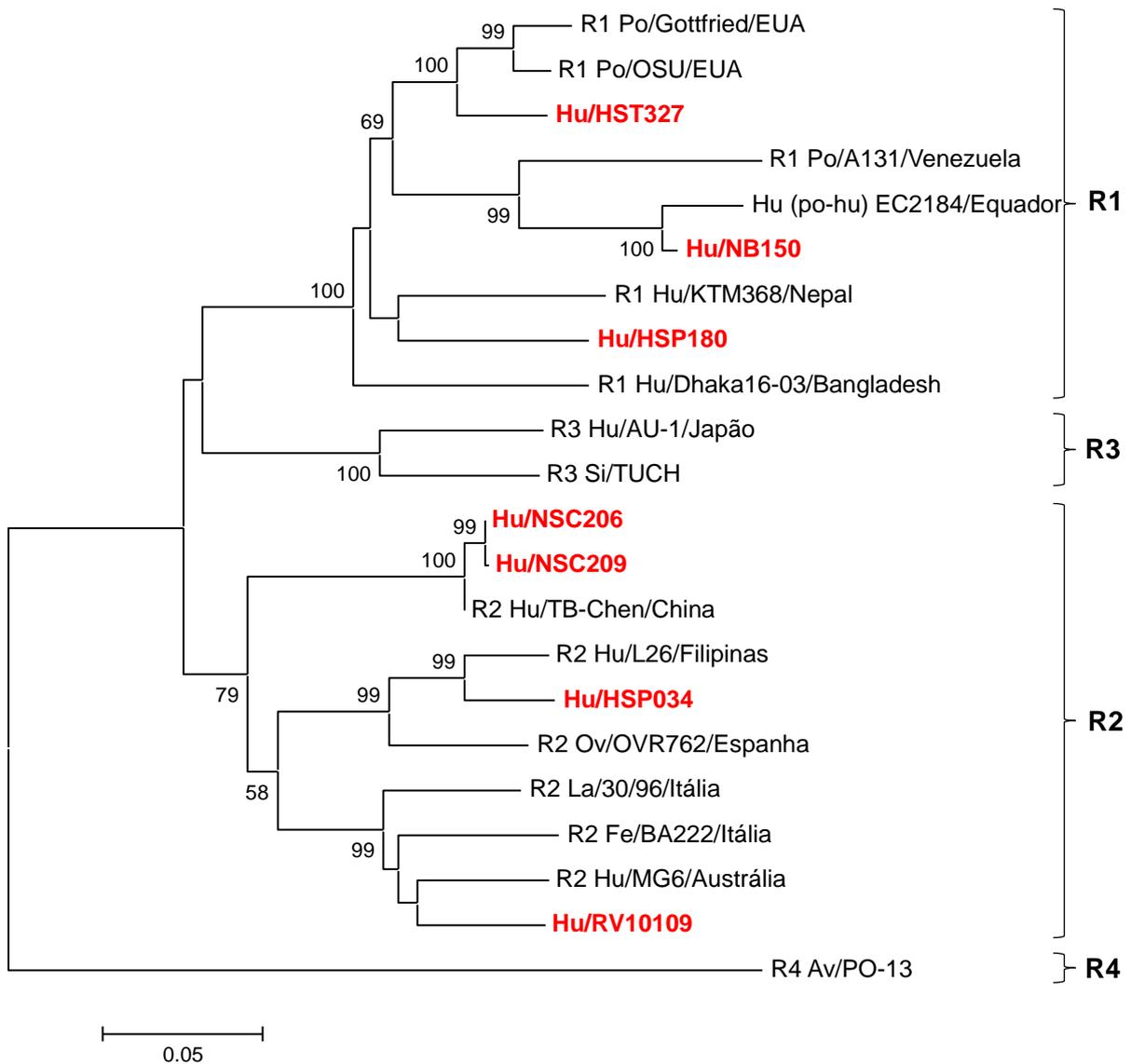


Figura 8 – Filograma representando a classificação das amostras do estudo em diferentes genótipos R de VP1¹ (657 pb). Foi utilizado o método de Neighbor-Joining² com o modelo de reconstrução filogenética K2p. Os valores de *Bootstrap* (2.000 réplicas) estão indicados nos nós da árvore.

¹ MATTHIJNSSENS et al., 2008a.; ² SAITOU E NEI, 1987.

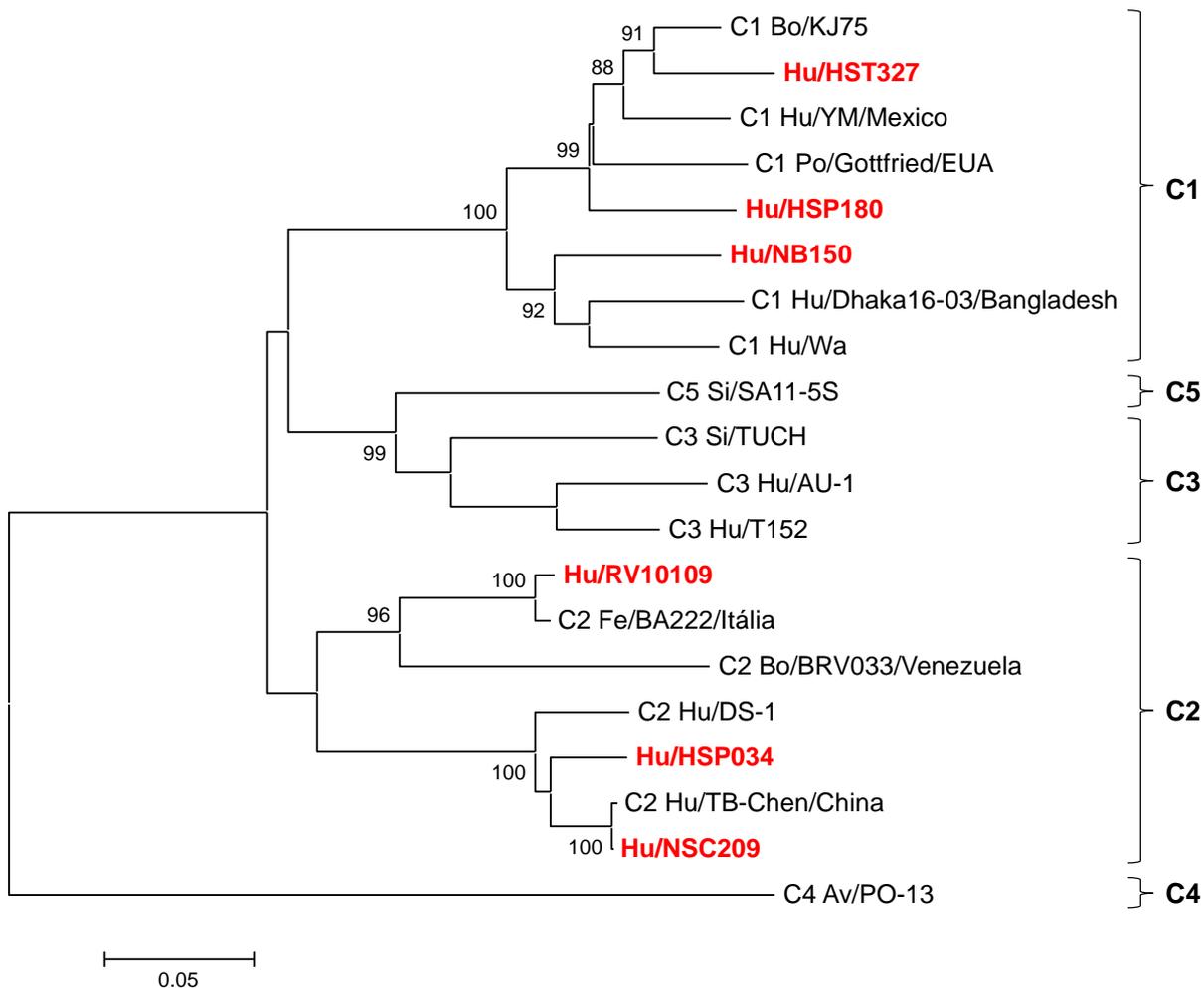


Figura 9 – Filograma representando a classificação das amostras do estudo em diferentes genótipos C de VP2¹ (665 pb). Foi utilizado o método de Neighbor-Joining² com o modelo de reconstrução filogenética K2p. Os valores de *Bootstrap* (2.000 réplicas) estão indicados nos nós da árvore.

¹ MATTHIJNSSENS et al., 2008a; ² SAITOU E NEI, 1987.

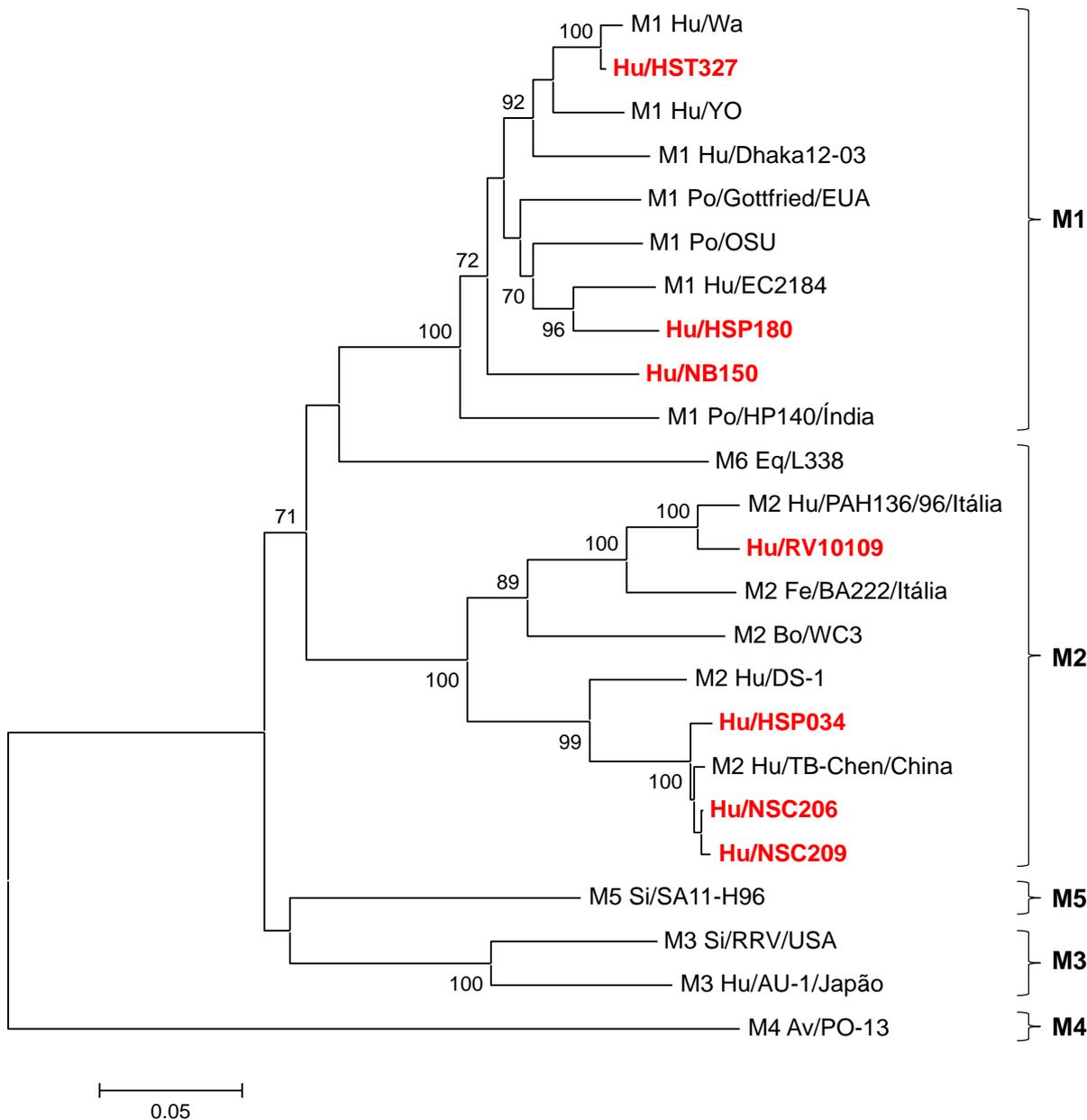


Figura 10 – Filograma representando a classificação das amostras do estudo em diferentes genótipos M de VP3¹ (631 pb). Foi utilizado o método de Neighbor-Joining² com o modelo de reconstrução filogenética K2p. Os valores de *Bootstrap* (2.000 réplicas) estão indicados nos nós da árvore.

¹ MATTHIJNSSENS et al., 2008a; ² SAITOU E NEI, 1987.

6.2. GENES NÃO-ESTRUTURAIIS:

No que tange aos genes não estruturais, das amostras analisadas para o gene *NSP1*, foi possível determinar o genótipo das amostras NB150 e HST327 (genótipo A1); HSP034, NSC206 e NSC209, (genótipo A2); RV10109 (genótipo A3); e HSP180 (genótipo A8) de acordo com a Figura 11.

A amostra RV10109, genótipo A3 da *NSP1* agrupou (*bootstrap* de 100%) com o protótipo de origem felina (BA222) e com o de origem humana (PAH136) com similaridades de 97,3% e 93%, respectivamente. Por outro lado, a amostra NB150 agrupou no genótipo A1 com a amostra de origem humana BE00048 oriunda da Bélgica enquanto que a HST327 agrupou no genótipo A1 com amostra de origem suína (RU172) com similaridade de 82,2% e a amostra HSP180 no genótipo A8 também com o suíno Gottfried (*bootstrap* de 100%).

Foram identificados dois genótipos para o gene *NSP2*, dentre as amostras sequenciadas (6/8; 75%): genótipo N1 com três amostras e N2 com três (Figura 12). A amostra RV10109 agrupou no genótipo N1, apresentando similaridade de 98% com o protótipo BA222 de origem felina, formando um grupo coeso corroborado por *bootstrap* de 100%.

Foram analisadas 100% (8/8) das amostras para o gene *NSP3*, ocorrendo o agrupamento em quatro genótipos distintos: T1 (n=2), T2 (n=4), T3 (n=1) e T7 (n=1).

Para o genótipo T1 da *NSP3* as amostras HST327 e NB150 juntamente com a EC2184 de origem humana-suína do Equador, formaram um grupo, corroborado por *bootstrap* de 100%. A amostra HSP180 agrupou no genótipo T7 (*bootstrap* de 100) com o protótipo de origem bovina UK, apresentando similaridade de 93,1% (Figura 13).

Um grupo coeso foi formado dentre as amostras NB150, HST327, HSP180 e HST034 analisadas para o gene *NSP4*, agrupando-as no genótipo E1 juntamente com o representante de origem suína OSU, enquanto que a amostra RV10109 agrupou no genótipo E3 juntamente com a amostra KF17 que apresenta característica felina (Figura 14).

Para o gene *NSP5/6* foi realizado o sequenciamento de nucleotídeos e a análise filogenética em 100% das amostras analisadas com classificação em três genótipos distintos: H1 (n=3), H2 (n=4) e H3 (n=1) (Figura 15).

A amostra RV10109, genotipo H3 da NSP5/6, agrupou com a amostra de origem felina BA222 (*bootstrap* de 100), com similaridade de 98,9%. As amostras NB150 e HST327 (genotipo H1) apresentaram similaridades de 97,4% e 98,5%, respectivamente, com o protótipo de origem suína Gottfried. A amostra HSP180 apresentou maior similaridade (95,4%) com a amostra RMC321.

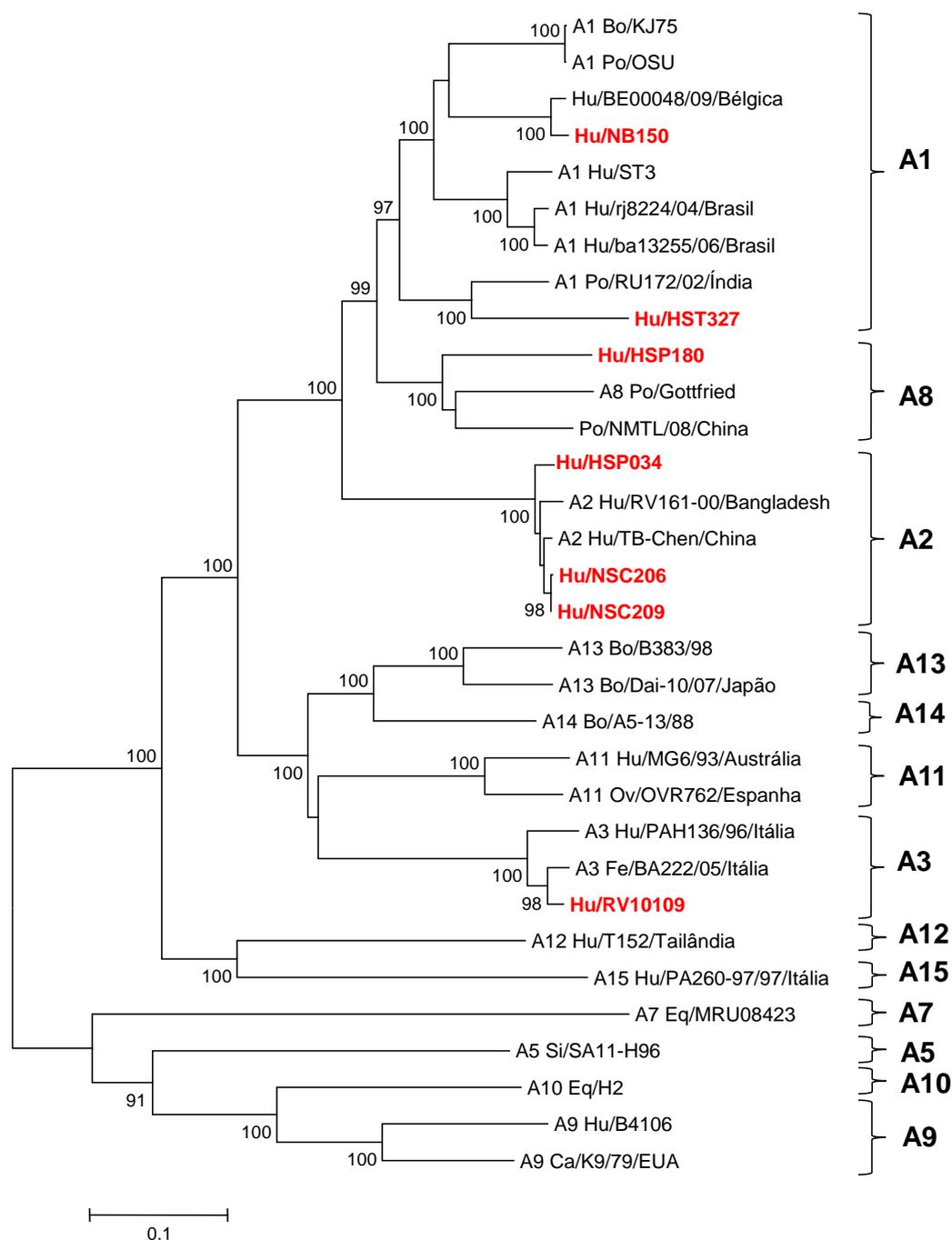


Figura 11 – Filograma representando a classificação das amostras do estudo em diferentes genótipos A de NSP1¹ (1498 pb). Foi utilizado o método de Neighbor-Joining² com o modelo de reconstrução filogenética K2p. Os valores de *Bootstrap* (2.000 réplicas) estão indicados nos nós da árvore.

¹ MATTHIJNSSENS et al., 2008a; ² SAITOU E NEI, 1987.

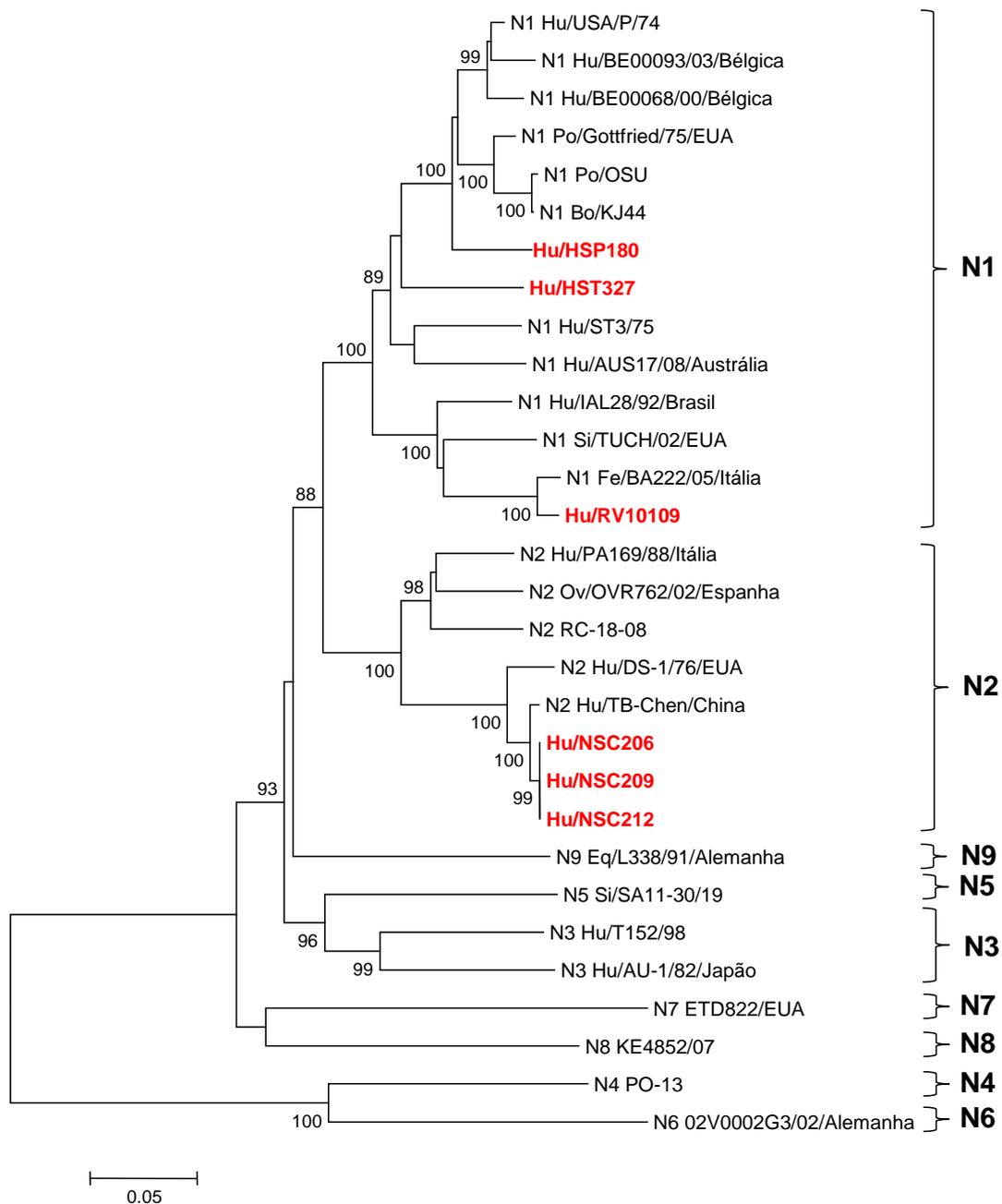


Figura 12 - Filograma representando a classificação das amostras do estudo em diferentes genótipos N de NSP2¹ (958 pb). Foi utilizado o método de Neighbor-Joining² com o modelo de reconstrução filogenética K2p. Os valores de *Bootstrap* (2.000 réplicas) estão indicados nos nós da árvore.

¹ MATTHIJNSSENS et al., 2008a; ² SAITOU E NEI, 1987

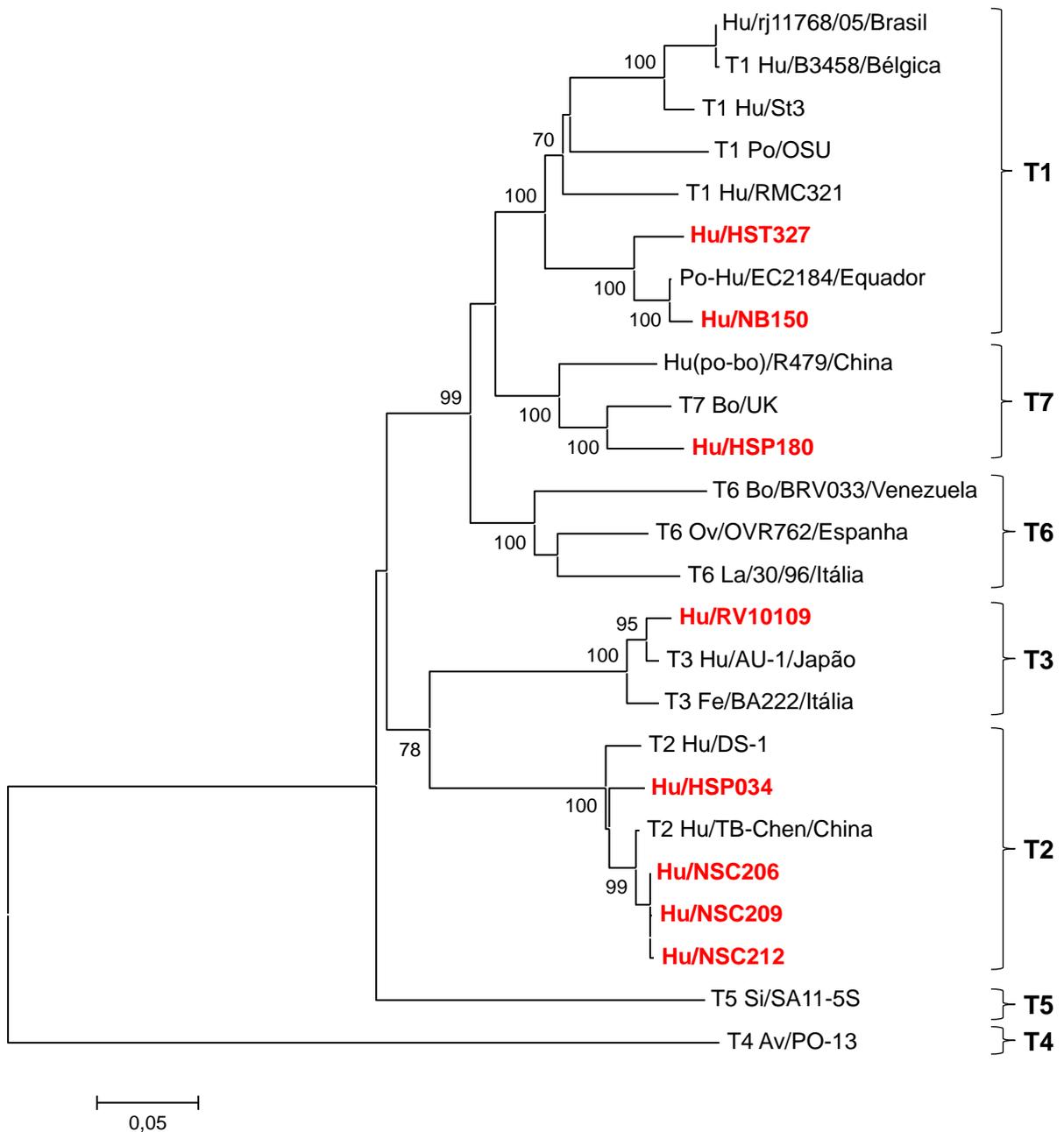


Figura 13 – Filograma representando a classificação das amostras do estudo em diferentes genótipos T de NSP3¹ (939 pb). Foi utilizado o método de Neighbor-Joining² com o modelo de reconstrução filogenética K2p. Os valores de *Bootstrap* (2.000 réplicas) estão indicados nos nós da árvore.

¹ MATTHIJNSSENS et al., 2008a; ² SAITOU E NEI, 1987.

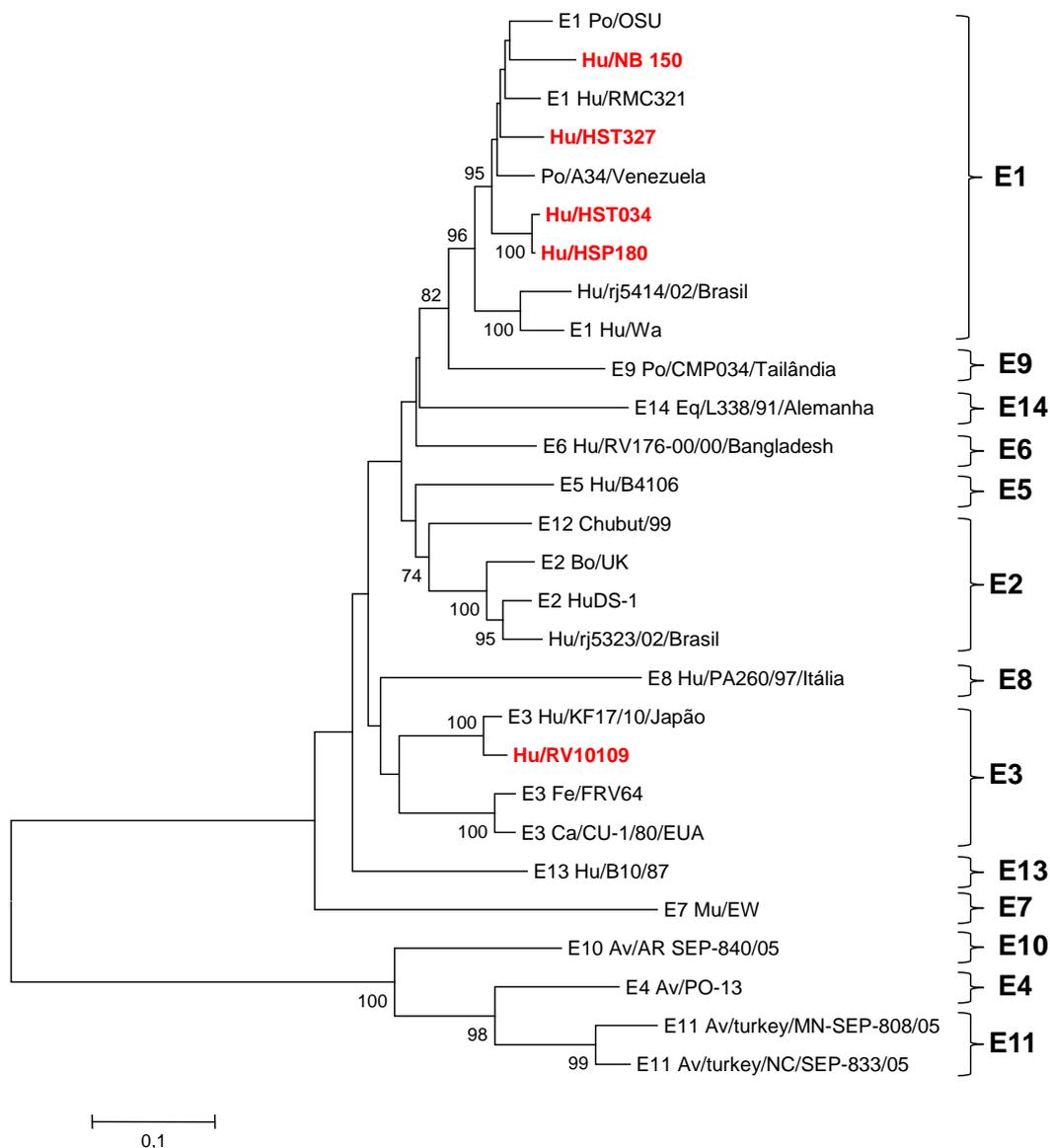


Figura 14 – Filograma representando a classificação das amostras do estudo em diferentes genotipos E de NSP4¹ (531 pb). Foi utilizado o método de Neighbor-Joining² com o modelo de reconstrução filogenética K2p. Os valores de *Bootstrap* (2.000 réplicas) estão indicados nos nós da árvore.

¹ MATTHIJNSSENS et al., 2008a; ² SAITOU E NEI, 1987.

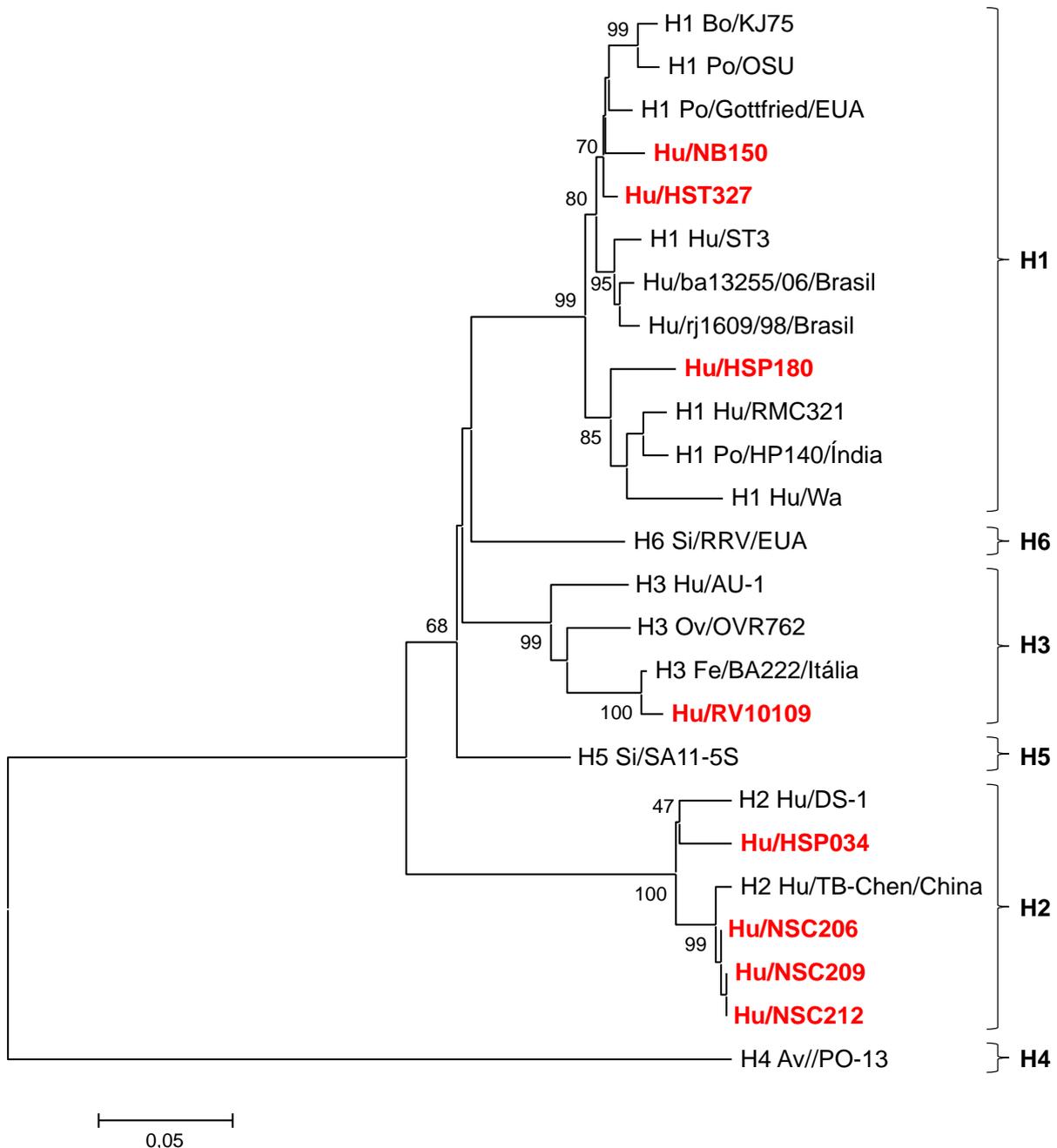


Figura 15 – Filograma representando a classificação das amostras do estudo em diferentes genótipos H de NSP5/6¹ (601 pb). Foi utilizado o método de Neighbor-Joining² com o modelo de reconstrução filogenética K2p. Os valores de *Bootstrap* (2.000 réplicas) estão indicados nos nós da árvore.

¹ MATTHIJNSSENS et al., 2008a; ² SAITOU E NEI, 1987.

7. DISCUSSÃO

O presente estudo fornece evidências para apoiar a hipótese de que há uma interação dinâmica entre os RVs que infectam seres humanos e, em particular, algumas espécies animais como bovinos, suínos, felinos e caninos, indicando que há um constante fluxo de material genético entre cepas de origem humana e animal, e que os RVs de animais podem cruzar a barreira das espécies e causar gastroenterite em seres humanos (ISEGAWA et al., 1992; LI et al., 1993; NAKAGOMI et al., 1993; PALOMBO, 2002; LAIRD et al., 2003; KHAMRIN et al., 2006; MATTHIJNSSENS et al., 2006; 2008b; BANERJEE et al., 2007; DE GRAZIA et al., 2007).

No que tange ao estudo de infecção nosocomial as amostras NSC206, NSC209 e NSC212 foram provenientes de crianças, menores de dois anos, hospitalizadas com gastroenterite aguda em Belém, Brasil e analisadas por Gusmão et al. (1994) que identificaram um eletroferotipo atípico (5-1-3-2) para o RVs-A com configuração de perfil aviário, sugerindo assim uma possível transmissão entre espécies. Contudo, quando essas amostras foram analisadas para a maioria dos genes as mesmas não evidenciaram genes sugestivos de eventuais permutas envolvendo RVs de origem animal. Dessa forma se evidencia a importância dos testes moleculares complementares a fim de confirmar os testes de EGPA.

A amostra NB-150 foi obtida em 1997 a partir de um neonato apresentando diarreia leve/moderada adquirida na comunidade e situada na periferia de Belém, Brasil sob precárias condições sanitárias e convivendo com animais domésticos, incluindo suínos (LINHARES et al., 2002). Estudo posterior demonstrou que os genes *VP4* e *NSP4* estavam estritamente relacionados à origem suína (MASCARENHAS et al., 2007a). Na presente análise, os genes *VP1*, *NSP3* e *NSP5/6* também apresentaram similaridade com genes de origem suína e a *VP7*, *VP6*, *VP2* e *NSP1* estritamente relacionados a amostras de origem humana. Para o gene *VP3* não foi possível determinar a sua origem. Tal amostra quando analisada para o gene *NSP4* juntamente com a HST327, HSP034 e HSP180 agruparam no mesmo ramo da árvore com a RMC321, revelando o caráter suíno dos genes das amostras de Belém (VARGHESE et al., 2004; 2006).

Uma ligação genética tem sido relatada entre os genes *VP6* e *NSP4* no que tange aos agrupamentos genotípicos I1 e E1 bem como I2 e E2 (ITURRIZA-GÓMARA et al., 2003; BENATI et al., 2010), como apresentou a amostra NB150 e HSP180 com o genotipo I1 (*VP6*) e E1 (*NSP4*). A amostra NB-150 quando comparada a EC2184, apresentou 97% de similaridade para o gene *VP1* e 98,7% para o gene *NSP3*. Bányai et al. (2009) identificaram na amostra EC2184 a ocorrência de evento de rearranjo humano-suíno para os genes *VP1*, *VP2*, *VP3*, *VP4*, *NSP1*, *NSP4* e *NSP5/6*, contudo a relação genética do gene *NSP3* não pôde ser resolvida, embora fosse mais relacionada com amostras rearranjadas, do que propriamente humana.

Conforme descrito previamente por Mascarenhas et al. (2007b) o gene *VP4* das amostras HSP180, HSP034 e NB150, analisado para o genotipo P[6], agrupou na linhagem I, sem no entanto agrupar especificamente em nenhuma das sublinhagens propostas, porém apresentou similaridade com representantes da sublinhagem Ib de origem suína. Contudo, Martella et al., (2008) em estudo conduzido em uma criança com diarreia hospitalizada na Itália confirmaram o agrupamento da NB150 na linhagem I seguido de classificação na sublinhagem e utilizando a sequência depositada no *GenBank*.

O genotipo P[6] normalmente é associado com infecção assintomática, contudo as amostras HSP180, HSP034 e NB150 apresentaram diarreia leve/moderada (STEELE et al., 1995; PAGER et al., 2000; CUNLIFFE et al., 2002).

A amostra HST327 foi coletada em 1999 a partir de uma criança com diarreia e primeiramente analisada para os genes *VP4* e *NSP4* por Mascarenhas et al. (2007b) que a caracterizaram com perfil suíno para o gene *VP4* e pertencente ao genotipo B da *NSP4*. No presente estudo os genotipos apresentados foram G4-P[6]-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1, sendo que os genes *VP1*, *VP2*, *VP4*, *NSP1*, *NSP3*, *NSP4* e *NSP5/6* agruparam com protótipo de origem suína.

Para o genotipo C1 da *VP2* as amostras HST327 e HSP180, ficaram reunidas com a amostra de origem bovina KJ75, sendo que Park et al. (2011) constataram que a amostra KJ75 proveniente de um bovino apresentou o genotipo G5 similar a suíno e o genotipo P[5] de bovino; curiosamente a grande maioria dos demais genes incluindo o *VP2* possuíam semelhança com protótipos suínos. Desta maneira o gene

VP2 das amostras HST327 e HSP180 agruparam com amostra de origem bovina que apresentou o segmento da VP2 com similaridade suína.

Para o gene NSP1 a amostra HST327 apresentou maior similaridade com a amostra de origem suína da Índia (GHOSH et al., 2010) quando comparada com as circulantes no Brasil e (TORT et al., 2010).

Na análise do gene *NSP3*, a HST327 apresentou similaridade de 95,5% com a amostra EC2184, porém a relação genética do gene *NSP3* desta amostra mostrou-se confusa, embora fosse mais intimamente relacionada com amostras que sofreram rearranjo suíno-humano, do que com genes de RVs humano (BÁNYAI et al., 2009). Contudo, a HST327 apresentou similaridade de 88,3% (gene *NSP3*) e 92,9% (gene *NSP4*) quando comparada com a RMC321 isolada em humano e analisada por Varghese et al. (2004; 2006) que possui quase todos os genes semelhantes a suíno, com exceção da VP7, reforçando a possível ligação do gene *NSP3* e *NSP4* da amostra HST327 com genes de origem suína.

Para a amostra HSP034 foi determinado o genótipo G2-P[6]-R2-C2-M2-A2-T2-E1-H2, sendo que apenas os genes *VP4* (P[6]) e *NSP4* (E1) apresentaram semelhança com genes de origem suína, enquanto os genes *VP7*, *VP1*, *VP2*, *VP3*, *NSP1*, *NSP3* e *NSP5/6* apresentaram homologia com genes humanos.

Na análise para o gene *VP1*, a amostra HSP034 agrupou no genótipo R2 juntamente com o protótipo de origem humana L26 e a OVR762, de origem ovina. Contudo, Matthijssens et al. (2009) demonstraram que o genótipo R2 da OVR762 foi caracterizado como não muito conservado, demonstrando ainda que esta amostra possuía uma forte relação com cepas de origem humana (MG6, Hun5). Desta maneira podemos inferir que o gene *VP1* da HSP034 possui grandes indícios de ser um gene com predominância humana se comparado às demais amostras. O gene *NSP4* (M1) da amostra HSP034 apresentou maior semelhança com a amostra que sofreu recombinação da Índia RMC321 (VARGHESE et al., 2004; 2006), seguido do protótipo OSU, revelando a origem suína desse gene.

A HSP180 apresentou o genótipo G4-P[6]-I1-R1-C1-M1-A8-N1-T7-E1-H1, sendo que os genes *VP7*, *VP4*, *VP2*, *VP3*, *NSP1*, *NSP4* e *NSP5/6* apresentaram semelhança com amostras de origem suína, *NSP3* com origem bovina e o *VP6*, *VP1*, e *NSP2* com origem humana. Para o genótipo G4, esta amostra agrupou na

linhagem VII, sub-linhagem VIIc, sendo que nessa linhagem encontra-se o genótipo G4P[6] de perfil suíno descrito por PARRA et al. (2008).

Wang et al. (2010) relataram que o isolado R479 coletado de uma criança de dois anos com diarreia, apresentou os genes *VP1-VP4*, *VP6*, *NSP1*, *NSP4* e *NSP5/6* relacionados com amostras de RVs suínos ou rearranjo suíno-humano, enquanto o gene *NSP3* (T7) apresentou semelhanças com gene bovino, sugerindo que a R479 pode ser um vírus recombinante. Essa amostra apresentou 88,8% de similaridade com a HSP180 agrupando no genótipo bovino T7 com o protótipo G5P[5] de origem bovina UK, reforçando a hipótese de que a amostra HSP180 possa ser um vírus recombinante.

O caráter suíno do gene *VP3* (M1) é subsidiado devido à alta semelhança dessa amostra com a amostra EC2184, que possui um rearranjo suíno-humano (BÁNYAI et al., 2009) e com o protótipo suíno (OSU).

A amostra RV10109 foi obtida a partir de uma criança diarreica no ano de 2006 e foi classificada nos genótipos G3-P[9]-R2-C2-M2-A3-N1-T3-E3-H3. Os genes *VP7*, *VP2*, *NSP1*, *NSP2*, *NSP4* e *NSP5/6* foram estritamente relacionados a amostras de origem felina; *VP4*, e *NSP3* (origem humana), enquanto que para os genes *VP1* e *VP3* não foi possível determinar a sua origem. Além disso, o genótipo G3 dessa amostra agrupou com representantes da Austrália (Cat2) G3P[9], isolada de um felino assintomático (BIRCH et al., 1985). Embora existam poucos relatos sobre RVs de origem felina, estudos conduzidos por Birch et al. (1985), Gouvea et al. (1994), Taniguchi et al. (1994) e Mochizuki et al. (1997), demonstraram que todas as cepas do RVs de origem felina apresentaram o genótipo G3P[3] ou G3P[9]. Nos EUA, o genótipo G3P[9] é raramente detectado, ocorrendo em média uma vez ao ano (GRIFFIN et al., 2000; HULL et al., 2011).

Raramente o genótipo P[9] está associado com o genótipo G3 de origem humana, normalmente o G3 encontra-se associado ao genótipo P[8] ou P[6] (DE GRAZIA et al., 2008; SANTOS E HOSHINO, 2005), contudo a amostra RV10109 de genótipo G3P[9] apresentou esse padrão atípico.

Desde a detecção inicial do protótipo humano AU-1 (G3P[9]) no Japão, cepas G3P[9] de RVs tem sido identificadas com maior frequência em seres humanos, quando comparado com amostras do genótipo G3P[3] (NAKAGOMI et al., 1987), sendo que amostras G3P[9] têm sido detectados em vários países, incluindo China,

Hungria, Israel, Itália, Japão, Espanha, Tailândia e Estados Unidos (NAKAGOMI et al., 1987; 1992; IIZUKA et al., 1994; GOLLOP et al., 1998; CAO et al., 1999; GRIFFIN et al., 2002; SÁNCHEZ-FAUQUIER et al., 2006; KHAMRIN et al., 2007; DE GRAZIA et al., 2008; WANG et al., 2009; BÁNYAI et al., 2003).

Acredita-se que cepas humanas pertencentes ao genotipo G3 combinado com P[3] ou P[9], possam ter origem de transmissão direta de cães ou gatos para seres humanos (LI et al., 1993; NAKAGOMI E NAKAGOMI, 2002; TSUGAWA E HOSHINO, 2008). As amostras G3P[9] de origem humana e felina são muito semelhantes se comparadas com amostras de origem bovina e canina, sugerindo que estas, provavelmente evoluíram a partir de rearranjos múltiplos envolvendo diferentes hospedeiros e espécies (MOCHIZUKI et al., 1992; GOLLOP et al., 1998; CAO et al., 1999; GRIFFIN et al., 2002; NAKAGOMI E NAKAGOMI, 2002; TSUGAWA E HOSHINO, 2008; WANG et al., 2009). Os genes *VP7*, *VP2*, *NSP1*, *NSP2* e *NSP5* da amostra RV10109 apresentaram semelhança com genes de origem felina, corroborando com os achados de Tsugawa e Hoshino (2008) que analisando as cepas G3P[3], Ro1845 e HCR3A de origem humana, revelaram estar intimamente relacionadas com a cepa felina (Cat97).

Estudos têm demonstrado que a transmissão de RVs entre espécies (animais – humanos), apesar de ser rara, está ocorrendo na natureza, como o que possivelmente ocorreu nas amostras NB150, HSP034, HSP180, HST327 e RV10109 onde verificou-se a ocorrência de eventos de rearranjo em 62,5% (5/8) das amostras analisadas.

Em resumo, o estudo é pioneiro na região amazônica e demonstra a circulação de amostras não usuais de RVs sugerindo origem felina, suína, bovina e a recombinante suína e ovina em crianças e neonato com diarreia aguda em Belém, norte do Brasil. A considerar o presente cenário pós-introdução das vacinas contra RVs em vários países, particularmente na América Latina, cabe destacar a importância dos achados, face à eventual emergência de cepas que possam representar um desafio às vacinas ora em uso introduzidas em escala progressiva nos programas nacionais de imunização. Nesse contexto, destaquem-se RVs emergentes que possam se mostrar refratários à imunidade induzida pela vacina (as *escape mutants*).

8. CONCLUSÕES

- A ocorrência de eventos de rearranjo entre genes provenientes de seres humanos e animais foi de 62,5% (5/8).
- Foram identificados os genótipos circulantes G4, P[6], R1, C1 e M1 semelhante a suíno e G3 e C2 semelhante a felino.
- Dentre as proteínas não-estruturais de RVs semelhante a suíno os genótipos circulantes foram A1, T1, E1, E3, H1, A3, A8, N1 e H3 semelhante a felino e T7 semelhante a bovino.
- As amostras semelhante ao perfil eletroforético aviário, não demonstraram características genéticas animalis nos genes analisados.

9. PERSPECTIVAS

Estudos adicionais são necessários visando caracterizar geneticamente os genes que codificam para as proteínas estruturais e não-estruturais de RVs envolvendo amostras oriundas tanto de crianças quanto de animais com o objetivo de medir a real frequência dos eventos de transmissão entre espécies na região norte do Brasil, antes e após a implantação da vacina anti-RVs. Tais estudos são de grande importância e para tanto, torna-se fundamental o conhecimento dos genótipos circulantes, particularmente quando um programa nacional de imunização decide pela introdução de uma vacina específica, no caso do Brasil, a vacina monovalente para o genótipo G1P[8].

REFERÊNCIAS

ABE, M.; ITO, N.; MASATANI, T.; NAKAGAWA, K.; YAMAOKA, S.; KANAMARU, Y.; SUZUKI, H.; SHIBANO, K.; ARASHI, Y.; SUGIYAMA, M. Whole genome characterization of new bovine rotavirus G21P[29] and G24P[33] strains provides evidence for interspecies transmission. **Journal of General Virology**, v.11, n. 2, p. 504-511, 2011.

AFONSO, A.; ANTUNES H. Infecção por rotavírus: implicações e custos. **Acta Pediátrica Portuguesa**, v. 38, p. 138-143, 2007.

AHMED, K.; ANH, D.D.; NAKAGOMI, O. - Rotavirus G5P[6] in child with diarrhea. Vietnam. **Emerging Infectious Diseases journal**, v. 13, p. 1232–1235, 2007.

AOKI, S.T.; SETTEMBRE, E.C.; TRASK, S.D.; GREENBERG, H.B.; HARRISON, S.C.; DORMITZER, P.R. Structure of rotavirus outer-layer protein VP7 bound with a neutralizing **Science**, v. 12, n. 324, p. 1444-1447, 2009.

ARAÚJO, I.T.; HEINEMANN, M.B.; MASCARENHAS, J.D.P.; ASSIS, R.M.S.; FIALHO, A.M.; LEITE, J.P.G. Molecular analysis of NSP4 and VP6 genes of rotavirus strains recovered from hospitalized children in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, p. 854–859, 2007.

ARAÚJO, E.C.; CLEMENS, S.A.C.; OLIVEIRA, C.S.; JUSTINO, M.C.A.; RUBIO, P.; GABBAY, Y.B.; DA SILVA, V.B.; MASCARENHAS, J.D.P.; NORONHA, V.L.; CLEMENS, R.; GUSMAO, R.H.P.; SANCHEZ, N.; MONTEIRO, T.A.F.; LINHARES, A.C. Segurança, imunogenicidade e eficácia protetora de duas doses da vacina RIX4414 contendo rotavírus atenuado de origem humana. **Journal of Pediatrics**, v.83, n. 5, p. 217-224, 2007.

ARAÚJO, I.T.; FIALHO, A.M.; DE ASSIS, R.M.; ROCHA, M.; GALVÃO, M.; CRUZ, C.M.; FERREIRA, M.S.; LEITE, J.P. Rotavirus strain diversity in Rio de Janeiro, Brazil: characterization of VP4 and VP7 genotypes in hospitalized children. **Journal of Tropical Pediatrics**, v. 48, p. 214–218, 2002.

ARIAS, C.F.; DECTOR, M.A.; SEGOVIA, L.; LOPEZ, T.; CAMACHO, M.; ISA, P.; ESPINOSA, R.; LOPEZ, S. RNA silencing of rotavirus gene expression. **Virus Research**, v.102, n. 1, p. 43-51, 2004.

ARISTA, S.; GIAMMANCO, G.M.; DE GRAZIA, S.; COLOMBA, C.; MARTELLA, V. Genetic variability among serotype G4 Italian human rotaviruses. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 1420-1425, 2005.

ARORA, R.; CHITAMBAR, S.D. Full genomic analysis of Indian G1P[8] rotavirus strains. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 11, n. 2, p. 504-511, 2011.

AZEVEDO, A.S.; YUAN, L.; JEONG, K.I.; GONZALEZ, A.; NGUYEN, T.V.; POULY, S.; GOCHNAUER, M.; ZHANG, W.; AZEVEDO, A.; SAIF, L.J. Viremia and nasal and retal shedding of rotavirus in gnotobiotic pigs inoculated with Wa human rotavirus. **Journal of Virology**, v. 79, p. 5428–5436, 2005.

BALL JM, MITCHELL DM, GIBBONS TF, PARR RD. Rotavirus NSP4: a multifunctional viral enterotoxin. **Viral Immunol**, n.18, 2-3, 2005.

BALL, J.M.; TIAN, P.; ZENG, C.Q.Y.; MORRIS, A.P.; ESTES, M.K. Age-dependent diarrhea induced by a rotaviral nonstructural glycoprotein. **Science**, v. 272, p. 101-104, 1996.

BANERJEE, I.; ITURRIZA-GÓMARA, 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.

BÁNYAI, K.; GENTSCH, J.R.; GRIFFIN D.D.; HOLMES J.L.; GLASS R.I.; SZÜCS G. Genetic variability among serotype G6 human rotaviruses: identification of a novel lineage isolated in Hungary. **Journal of Medical Virology**, v. 71, p. 124–134, 2003.

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

BÁNYAI, K.; MIJATOVIC-RUSTEMPASIC, S.; HULL, J.J.; ESONA, M.D.; FREEMAN, M.M.; FRACE, A.M.; BOWEN, M.D.; GENTSCH, J.R. - Sequencing and phylogenetic analysis of the coding region of six common rotavirus strains: Evidence for intragenogroup reassortment among co-circulating G1P[8] and G2P[4] strains from the United States. **Journal of Medical Virology**, n. 83, v. 3, p. 532-539, 2011.

BÁNYAI, K.; ESONA, M.D.; KERIN, T.K.; HULL, J.J.; MIJATOVIC, S.; VÁSCONEZ, N.; TORRES, C.; FILIPPIS, A.M.B.; GENTSCH, J.R. - Molecular characterization of a rare, human-porcine reassortant rotavirus strain, G11P[6], from Ecuador. **Archives of Virology**, v. 154, p. 1823-1829, 2009.

BEISNER, B.; KOOL, D.; MARICH, A.; HOLMES, I.H. Characterization of G serotype dependent non-antibody inhibitors of rotavirus in normal mouse serum. **Archives of Virology**, v. 143, p. 1277–1294, 1998.

BENATI, F.J.; MARANHÃO, A.G.; LIMA, R.S.; SILVA, R.C.; SANTO, N. Multiple-Gene Characterization of Rotavirus Strains: Evidence of Genetic Linkage Among the VP7-, VP4-, VP6-, and NSP4-Encoding Genes. **Journal of Medical Virology**, v. 82, p. 1797–1802, 2010.

BIRCH, C.J.; HEATH, R.L.; MARSHALL, J.A.; LIU, S.; GUST, I.D. Isolation of feline rotaviruses and their relationship to human and simian isolates by electropherotype and serotype. **Journal of General Virology**, v. 66, p. 2731–2735, 1985.

BISHOP, R.F.; DAVIDSON, G.P.; HOLMES, I.H.; RUCK, B.J. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. **Lancet**, v. 2, n. 7841, p. 1281-1283, 1973.

BOK, K.; MATSON, D.O.; GÓMEZ, J.A. - Genetic variation of capsid protein VP7 in genotype G4 human rotavirus strains: simultaneous emergence and spread of different lineages in Argentina. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 2016-2022, 2002.

BOOM, R.; SOL, C.J.A.; SALIMANS, M.M.M.; JANSEN, C.L.; WERTHEIM-VAN DILLEN, P.M.E., VAN DER NOORDAA, J. Rapid and simple method for purifications of nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, p. 495-503, 1990.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência e Saúde. Coordenação de Saúde materno-infantil. **Assistência e controle das doenças diarreicas**. Brasília: s.n., 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Doença Diarréica por Rotavírus: Vigilância Epidemiológica e Prevenção pela Vacina Oral de Rotavírus Humano – VORH**. Brasília: s.n., 2009. (Informe técnico).

CAO, X.R.; AKIHARA, S.; FANG, Z.Y.; NAKAGOMI, O.; USHIJIMA, H. Genetic variation in the VP4 and NSP4 genes of human rotavirus serotype 3 (G3 type) isolated in China and Japan. **Microbiol Immunol**, v. 43, p. 171–175, 1999.

COOK, S.M.; GLASS, R.I.; LEBARON, C.W.; HO, M.S. Global seasonality of rotavirus infections. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 68, p. 171-177, 1990.

CRAWFORD, S.E.; PATEL, D.G.; CHENG, E.; BERKOVA, Z.; HYSER, J.M.; CIARLET, M.; FINEGOLD, M.J.; CONNER, M.E.; ESTES, M.K. Rotavirus viremia and extraintestinal viral infection in the neonatal rat model. **Journal of Virology**, v. 80, n. 10, p. 4820-4832, 2006.

CUNLIFFE, N.A.; WOODS, P.A.; LEITE, J.P.G.; DAS, B.K.; RAMACHANDRAN, M.; BHAN, M.K.; HART, C.A.; GLASS, R.I.; GENTSCH, J.R. Sequence analysis of NSP4 gene of human rotavirus allows classification into two main genetic groups. **Journal of Medical Virology**, v. 53, n. 1, p. 41-50, 1997.

CUNLIFFE, N.A.; ROGERSON, S.; DOVE, W.; THINDWA, B.D.M.; GREENSILL, J.; KIRKWOOD, C.D.; BROADHEAD, R.L.; HART, C.A. Detection and characterization

of rotaviruses in hospitalized neonates in Blantyre, Malawi. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 1534–1537, 2002.

DA SILVA, M.F., TORT, L.F., GÓMEZ, M.M., ASSIS, R.M., DE MENDONÇA, M.C., VOLOTÃO, E.D.E.M., LEITE, J.P. Phylogenetic analysis of VP1, VP2, and VP3 gene segments of genotype G5 group A rotavirus strains circulating in Brazil between 1986 and 2005. **Virus Research**, v. 160, n. 1-2, p. 381-388, 2011.

DAS, B.K.; GENTSCH, J.R.; CICIRELLO, H.G.; WOODS, P.A.; RAMACHANDRAN, M.; GUPTA, A.; RAMACHANDRAN, M.; KUMAR, R.; BHAN, M.K.; GLASS, R.I. Characterization of rotavirus strains from newborns in New Delhi, India. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 7, p. 1820-1822, 1994.

DAVIDSON, G.P.; BISHOP, R.F.; TOWNLEY, R.R.; HOLMES, I.H. Importance of a new virus in acute sporadic enteritis in children. **Lancet**, v. 1, n. 7901, p. 242-246, 1975.

DE GRAZIA, S.; GIAMMANCO, G.M.; MARTELLA, V.; RAMIREZ, S.; COLOMBA, C.; CASCIO, A.; ARISTA, S. Rare AU-1-like G3P[9] human rotavirus with a Kun-like NSP4 gene detected in children with diarrhea in Italy. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, p. 357–360, 2008.

DE GRAZIA, S.; MARTELLA, V.; GIAMMANCO, G.M.; GÒMARA, M.I.; RAMIREZ, S.; CASCIO, A.; COLOMBA, C.; ARISTA, S. Canine-origin G3P[3] rotavirus strain in child with acute gastroenteritis. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, p. 1091–1093, 2007.

DE GRAZIA, S.; GIAMMANCO, G.M.; POTGIETER, C.A.; MATTHIJNSSENS, J.; BÁNYAI, K.; PLATIA, M.A.; COLOMBA, C.; MARTELLA, V. - Unusual Assortment of Segments in 2 Rare Human Rotavirus Genomes. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 5, p. 859-862, 2010.

DESSELBERGER, U. Genome rearrangements of rotaviruses. **Advances in Virus Research**, v. 46, p. 69-95, 1996.

DUNN, S.J.; FIORE, L.; WERNER, R.L.; CROSS, T.L.; BROOME, R.L.; RUGGERI, F.M.; GREENBERG, H.B.; Immunogenicity, antigenicity, and protection efficacy of baculovirus expressed VP4 trypsin cleavage products, VP5(1)* and VP8* from rhesus rotavirus. **Archives of Virology**, v. 140, n. 11, p. 1969-1978, 1995.

EL-ATTAR, L.; DHALIWAL, W.; ITURRIZA-GÓMARA, M.; BRIDGER, J.C. Identification and molecular characterization of a bovine G3 rotavirus which causes age-independent diarrhea in cattle. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 937–942, 2002.

ESONA, M.D.; GEYER, A.; BANYAI, K.; HULL, J.; PAGE, N.; AMINU, M.; ARMAH, G.E.; STEELE, A.D.; GLASS, R.I.; GENTSCH, J.R. - Novel human rotavirus strain (G5P[7]) in Cameroon. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, p. 83–86, 2009.

ESTES MK. Rotaviruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, editors. **Fields Virology**. 4th. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. P. 1426-1454.

ESTES, M.K; KAPIKIAN, A.Z. **Rotaviruses**. In: Knip, D.M. Howley, P.M. (Eds). **Fields Virology**, 5th ed. Lippincott William e Wilkim. Philadelphia, 2007, p. 1917-1974.

FISCHER, T.K.; EUGEN-OLSEN, J.; PEDERSEN, A.G.; MOLBAK, K.; BOTTIGER, B.; ROSTGAARD, K.; NIELSEN, N.M. Characterization of rotavirus strains in a Danish population: high frequency of mixed infections and diversity within the VP4 gene of P[8] strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 1099–1104, 2005.

FLEWETT, T.H.; BRYDEN, A.S.; DAVIES. Virus particles in gastroenteritis. **Lancet**, v. 2, p. 1947, 1973.

FLEWETT, T.H.; WOODE, G.N. The rotaviruses. Brief review. **Archives of Virology**, v. 57, n. 1, p. 1-23, 1978.

GABBAY, Y.B.; JIANG, B.; OLIVEIRA, C.S.; MASCARENHAS, J.D.P.; LEITE, J.P.G.; GLASS, R.I.; LINHARES, A.L. An Outbreak of Group C Rotavirus Gastroenteritis Among Children Attending a Day-care Centre in Belém, Brazil. **Journal of Diarrhoeal Diseases Research**, v. 17, n. 2, p. 69-74, 1999.

GABBAY, Y.B; BORGES, A.A.; OLIVEIRA, D.S.; LINHARES, A.C.; MASCARENHAS, J.D.P.; BARARDI, C.R.M.; SIMÕES, C.M.O.; WANG, Y.; GLASS, R.I.; JIANG, B. Evidence for Zoonotic Transmission of Group C Rotaviruses Among Children in Belém, Brazil. **Journal of Medical Virology**, v. 80, p. 1666–1674, 2008.

GENTSCH, J.R.; LAIRD, A.R.; BIELFELT, B.; GRIFFIN, D.D.; BANYAI, K.; RAMACHANDRAN, M.; JAIN, V.; CUNLIFFE, N.A.; NAKAGOMI, O.; KIRKWOOD, C.D.; FISCHER, T.K.; PARASHAR, U.D.; BRESEE, J.S.; JIANG, B.; GLASS, R.I. Serotype diversity and reassortment between human and animal rotavirus strains: implications for rotavirus vaccine programs. **Journal of Infectious Diseases**, v. 192, p. S146–S159, 2005.

GENTSCH, J.; GLASS, R.I; WIIDS, P.; GOUVEA, V.; GORZLIA, M.; FLORES, J.; DAS, B.K.; BHAN, M.K. Identification of group A rotavirus gene 4 types by Polymerase Chain Reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 6, p. 1365-1373, 1992.

GHOSH, S.; GATHERU, Z.; NYANGAO, J.; ADACHI, N.; URUSHIBARA, N.; KOBAYASHI N. - Full genomic analysis of a G8P[1] rotavirus strain isolated from an asymptomatic infant in Kenya provides evidence for an artiodactyl-to-human interspecies transmission event. **Journal of Medical Virology**, v.83, n.2, p. 367-376, 2011.

GHOSH, S.; KOBAYASHI, N.; NAGASHIMA, S.; CHAWLA-SARKAR, M.; KRISHNAN, T.; GANESH, B.; NAIK, T.N. - Full genomic analysis and possible origin of a porcine G12 rotavirus strain RU172. **Virus Genes**, v. 40, n. 3, p. 382-388, 2010.

GILIO, A. E., (Coord.). **Manual de imunizações**: Centro de Imunizações Hospital Israelita Albert Einstein. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2009.

GLASS, R.I. - New hope for defeating rotavirus. **Scientific American**, v. 294, n. 4, p. 46-51, 2006.

GLASS, R.I.; PARASHAR, U.D. The promise of new rotavirus vaccines. **New England Journal of Medicine**, v. 354, n. 1, p. 75-77, 2006.

GOLLOP, R.; NAKAGOMI, O.; SILBERSTEIN, I.; SHULMAN, L.M.; GREENBERG, H.B.; MENDELSON, E.; SHIF, I. Three forms of AU-1 like human rotaviruses differentiated by their overall genomic constellation and by the sequence of their VP8*. **Archives of Virology**, v. 143, p. 263– 277, 1998.

GOUVEA, V.; GLASS, R.I.; WOOD, P.; TANIGUCHI, K.; CLARK, F.H.; FORRESTER, B.; FANG, Z.Y. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 2, p. 276-282, 1990.

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

GOUVEA, V.; SANTOS, N. - Rotavirus serotype G5: An emerging cause of epidemic childhood diarrhoea. **Vaccine**, v. 17, p. 1291-1292, 1999.

GRAFF, J. W.; ETTAYEBI, K.; HARDY, M. E. Rotavirus NSP1 Inhibits NFκB Activation by Inducing Proteasome-Dependent Degradation of b-TrCP: A Novel Mechanism of IFN Antagonism. **PLoS Pathog**, v. 5, n. 1, p. 1-12, 2009.

GREENBERG, H.; MCAULIFFE, V.; VALDESUSO, J.; WYATT, R.; FLORES, J.; KALICA, A.; HOSHINO, Y.; SINGH, N. Serological analysis of the subgroup protein of rotavirus, using monoclonal antibodies. **Infection and Immunity**, v. 39, n. 1, p. :91-99, 1983.

GRIFFIN, D. D.; KIRKWOOD, C. D.; PARASHAR, U. D.; WOODS, P. A.; BRESEE, J. S.; GLASS, R.I.; GENTSCH, J.R. Surveillance of rotavirus strains in the United States: identification of unusual strains. The National Rotavirus Strain Surveillance System collaborating laboratories. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 2784–2787, 2000.

GRIFFIN, D. D.; NAKAGOMI, T.; HOSHINO, Y.; NAKAGOMI, O.; KIRKWOOD, C.D.; PARASHAR, U. D.; GLASS, R. I.; GENTSCH, J. R. Characterization of nontypeable rotavirus strains from the United States: identification of a new rotavirus reassortant (P2A[6],G12) and rare P3[9] strains related to bovine rotaviruses. **Virology**, v. 294, p. 256-269, 2002.

GUERRERO, C. A.; SANTANA, A. Y.; ACOSTA, O. Mouse intestinal villi as a model system for studies of rotavirus infection. **Journal of Virological Methods**, v. 168, n. 1, p. 22-30, 2010.

GUGLIELMI, K. M.; MCDONALD, S. M.; PATTON, J. T. Mechanism of intraparticle synthesis of the rotavirus double-stranded RNA genome. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, p. 18123-18128, 2010.

GURGEL, R. Q.; CORREIA, J. B.; CUEVAS, L. E. Effect of rotavirus vaccination on circulating virus strains. **Lancet**, v. 371, p. 301-302. 2008.

GUSMÃO, R. H. P.; MASCARENHAS, J. D. P.; GABBAY, Y. B; LINHARES, A. C. Nosocomial transmission of an avian-like rotavirus strain among children in Belém, Brazil. **Journal of Diarrhoeal Diseases Research**, v. 12, p. 129-132, 1994.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium**, v. 41, p. 95-98, 1999.

HEWISH, M. J.; TAKADA, Y.; COULSON, B. S. Integrins alpha2beta1 and alpha4beta1 can mediate SA11 rotavirus attachment and entry into cells. **Journal of Virology**, v. 74, n.1, p. 228-236, 2000.

HONG, S. K.; LEE, S. G.; LEE, S. A.; KANG, J. H.; LEE, J. H.; KIM, J. H.; KIM, D. S.; KIM, H. M.; JANG, Y. T.; MA, S. H.; KIM, S. Y.; PAIK, S. Y. Characterization of a G11, P[4] strain of human rotavirus isolated in South Korea. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, p. 3759–3761, 2007.

HORIE, Y.; MASAMUNE, O.; NAKAGOMI, O. Three major alleles of rotavirus NSP4 proteins identified by sequence analysis. **Journal of General Virology**, v. 78, p. 2341–2346, 1997.

HOSHINO, Y.; WYATT, R. G.; GREENBERG, H. B.; KALICA, A. R.; FLORES, J.; KAPIKIAN, A. Z. Serological comparison of canine rotavirus with various simian and human rotaviruses by plaque reduction neutralization and hemagglutination inhibition tests. **Infection and Immunity**, v. 41, p. 169–173, 1983.

HUANG, H.; SCHROEDER, F.; ESTES, M.K.; MCPHERSON, T.; BALL, J.M. Interaction of rotavirus non-structural protein 4 (NSP4) C- terminal peptides with model membranes. **Biochemical Journal**, v. 380, p. 723-33, 2004.

HULL, J. J.; TEEL, E. N.; KERIN, T. K.; FREEMAN, M. M.; ESONA, M. D.; GENTSCH, J. R.; CORTESE, M. M.; PARASHAR, U. D.; GLASS, R. I.; BOWEN, M. D. United States rotavirus strain surveillance from 2005 to 2008: genotype prevalence before and after vaccine introduction. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 30, p. S42–S47, 2011.

IIZUKA, M.; CHIBA, M.; MASAMUNE, O.; KAGA, E.; NAKAGOMI, T.; NAKAGOMI O. - A highly conserved genomic RNA constellation of Japanese isolates of human rotaviruses carrying G serotype 3 and P serotype 9. **Research in Virology**, v. 145:21–24, p. 1994.

ISEGAWA, Y.; NAKAGOMI, O.; NAKAGOMI, T.; UEDA, S. A VP4 sequence highly conserved in human rotavirus strain AU-1 and feline rotavirus strain FRV-1. **Journal of General Virology**, v. 73, p. 1939–1946, 1992.

ITURRIZA-GÓMARA, M.; ANDERTON, E.; KANG, G.; GALLIMORE, C.; PHILLIPS, W.; DESSELBERGER, U.; GRAY, J. Evidence for genetic linkage between the gene segments encoding NSP4 and VP6 proteins in common and reassortant human rotavirus strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 3566– 3573, 2003.

ITURRIZA-GÓMARA M, ISHERWOOD B, DESSELBERGER U, GRAY J - Reassortment *in vivo*: driving force for diversity of human rotavirus strains isolated in the United Kingdom between 1995 and 1999. **Journal of Virology**, v. 75, p. 3696-3705, 2001.

ITURRIZA-GÓMARA, M.; WONG, C.; BLOME, S.; DESSELBERGER, U.; GRAY, J. Molecular characterization of VP6 genes of human rotavirus isolates: correlation of genogroups with subgroups and evidence of independent segregation. **Journal of Virology**, v. 76, n. 13, p. 6596-6601, 2002.

JAIN, V.; DAS, B. K.; BHAN, M. K.; GLASS, R. I.; GENTSCH, J. R. Great diversity of group A rotavirus strains and high prevalence of mixed rotavirus infections in India. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 10, p. 3524-3529, 2001.

JAYARAM, H.; ESTES, M. K.; PRASAD, B. V. Emerging themes in rotavirus cell entry, genome organization, transcription and replication. **Virus Research**. V. 101, n. 1, p. 67-81, 2004.

JIN, Q.; WARD, R. L.; KNOWLTON, D. R.; GABBAY, Y. B.; LINHARES, A. C.; RAPPAPORT, R.; WOODS, P. A.; GLASS, R. I.; GENTSCH, J. R. Divergence of VP7 genes of G1 rotaviruses isolated from infants vaccinated with reassortant rhesus rotaviruses. **Archives of Virology**, v. 141, p. 2057–2076, 1996.

JOHANSEN K, HINKULA J, ESPINOZA F, LEVI M, ZENG C, RUDEN U, VESIKARI T, ESTES M, SVENSSON L. Humoral and cell-mediated immune responses in humans to the NSP4 enterotoxin of rotavirus. **Journal of Medical Virology**, v. 59, n. 3, p. 369-377, 1999.

KANG, B. K.; SONG, D. S.; JUNG, K. I.; LEE, C. S.; PARK, S. J.; OH, J. S.; AN, D. J.; YANG, J.S.; MOON, H.J.; LEE, S.S.; YOON, Y.D.; PARK, B.K. Genetic characterization of canine rotavirus isolated from a puppy in Korea and experimental reproduction of disease. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 19, p. 78–83, 2007.

KAPIKIAN, A. Z.; KIM, H. W.; WYATT, R. G. Reoviruslike agent in stools: association with infantile diarrhea and development of serologic tests. **Science**, v. 185, p 1049-1053, 1974.

KAPIKIAN, A. Z.; HOSHINO, Y.; CHANOCK, R. M. **Rotaviruses**. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M, GRIFFIN, D.E. (Ed.). **Fields Virology**. 4th. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p.1787-833; 2001.

KAPIKIAN, A. Z.; WYATT, R. G.; DOLIN, R.; THORNHILL, T. S.; KALICA, A. R.; CHANOCK, R.M. Visualization by immune electron microscopy of a 27 nm particle associated with acute infections nonbacterial gastroenteritis. **Journal of Virology**, v. 10, p. 1075-1081, 1972.

KEBAABETSWE, L. P.; SEBUNYA, T. K.; MATSHEKA, M. I.; NDUNGÚ, T. Detection and molecular characterisation of group a rotavirus from children in northern Botswana. **East African Medical Journal**, v. 82, n. 4, p. 203-208, 2005.

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.

KHAMRIN, P.; MANEEKARN, N.; PEERAKOME, S.; CHAN-IT, W.; YAGYU, F.; OKITSU, S.; USHIJIMA, H. Novel porcine rotavirus of genotype P[27] shares new phylogenetic lineage with G2 porcine rotavirus strain. **Virology**, v. 361, n. 2, p. 243-252, 2007.

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

KIRKWOOD, C. D.; GENTSCH, J. R.; GLASS, R. I.; Sequence analysis of the NSP4 gene from human rotavirus strains isolated in the United States. **Virus Genes**, v. 19, n. 2, p. 113-22, 1999.

LAIRD, A. R.; IBARRA, V.; RUIZ-PALACIOS, G.; GUERRERO, M. L.; GLASS, R. I.; GENTSCH, J. R. Unexpected detection of animal VP7 genes among common rotavirus strains isolated from children in Mexico. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 4400–4403, 2003.

LEE, J. B.; YOUN, S. J.; NAKAGOMI, T.; PARK, S. Y.; KIM, T. J.; SONG, C. S.; JANG, H. K.; KIM, B. S.; NAKAGOMI, O. Isolation, serologic and molecular characterization of the first G3 caprine rotavirus. **Archives of Virology**, v. 148, p. 643– 657, 2003.

LEITE, J. P. G.; CARVALHO-COSTA, F. A.; LINHARES, A. C. Group A rotavirus genotypes and the ongoing Brazilian experience. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, p. 745-753, 2008.

LEITE, J. P. G.; ALFIERI, A. A.; WOODS, P. A.; GLASS, R. I.; GENTSCH, J. R. Rotavirus G and P types circulating in Brazil: characterization by RT-PCR, probe hybridization, and sequence analysis. **Archives of Virology**, v. 141, p. 2365–2374, 1996.

LI, B.; CLARK, H. F.; GOUVEA, V. Nucleotide sequence of the VP4-encoding gene of an unusual human rotavirus (HCR3). **Virology**, v. 196, p. 825–830, 1993.

LINHARES, A. C.; GABBAY, Y. B.; FREITAS, R. B.; TRAVASSOS, D. A.; ROSA, E. S.; MASCARENHAS, J. D. P.; LOUREIRO, E. C. B. Longitudinal study of rotavirus infections among children from Belém, Brazil. **Epidemiology and Infection**, v. 102, n. 1, p. 129-45, 1989.

LINHARES, A. C.; RUIZ-PALACIOS, G. M.; GUERRERO, M. L.; SALINAS, B.; PEREZ-SCHAEL, I.; CLEMENS, A. S.; INNIS, B.; YARZABAL, J. P.; VESPA, G.; CERVANTES, Y.; HARDT, K.; DE VOS, B. A short report on highlights of world-wide development of RIX4414: a Latin American experience. **Vaccine**, v. 24, n. 18, p. 3784-3785, 2006.

LINHARES, A. C.; MASCARENHAS, J. D. P.; GUSMÃO, R. H. P.; GABBAY, Y. B.; FIALHO, A. M.; LEITE, J. P. G. Neonatal rotavirus infection in Belém, northern Brazil: nosocomial transmission of a P[6]G2 strain. **Journal of Medical Virology**, v. 67, p. 418–426, 2002.

LINHARES, A. C.; PINHEIRO, F. P.; SCHIMETZ, C.; MULLER, G.; PETTERS, D. Duovirus (Rotavírus) em Belém do Pará, Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 19, n. 4, p. 278-279, 1977.

LUDERT, J. E.; KRISHNANEY, A. A.; BURNS, J. W.; VO, P.T.; GREENBERG, H. B. Cleavage of rotavirus VP4 in vivo. **Journal of General Virology**, v. 77, p. 391-395, 1996.

LUNDGREN, O.; SVENSSON, L. The enteric nervous system and infectious diarrhea. **Journal of Virology**, v. 78, n. 19, p. 10213-10220, 2003.

MARTELLA, V.; CIARLET, M.; BANYAI, K.; LORUSSO, E.; CAVALLI, A.; CORRENTE, M.; ELIA, G.; ARISTA, S.; CAMERO, M.; DESARIO, C.; DECARO, N.; LAVAZZA, A.; BUONAVOGLIA, C. Identification of a novel VP4 genotype carried by a serotype G5 porcine rotavirus strain. **Virology**, v. 346, n. 2, p. 301-311, 2006a.

MARTELLA, V.; PRATELLI, A.; ELIA, G.; DECARO, N.; TEMPESTA, M.; BUONAVOGLIA, C. Isolation and genetic characterization of two G3P5A[3] canine rotavirus strains in Italy. **Journal of Virological Methods**, v. 96, p. 43-49, 2001.

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

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

MARTÍNEZ-LASO, J.; ROMÁN, A.; RODRIGUEZ, M.; CERVERA, I.; HEAD, J.; RODRÍ-GUEZ-AVIAL, I.; PICAZO, J.J. Diversity of G3 genes of human rotaviruses in isolates from Spain from 2004 to 2006: crossspecies transmission and inter-genotype recombination generates alleles. **Journal of General Virology**, v. 90, p. 935–943, 2009.

MASCARENHAS, J. D.; LIMA, C. S.; DE OLIVEIRA, D. S.; GUERRA, S. F.; MAESTRI R. P.; GABBAY, Y. B.; DE LIMA, I. C.; DE MENEZES, E. M.; LINHARES, A. C.; BENSABATH, G. Identification of Two Sublineages of Genotype G2 Rotavirus Among Diarrheic Children in Parauapebas, Southern Pará State, Brazil. **Journal of Medical Virology**, v. 82, p. 712–719, 2010.

MASCARENHAS, J. D.; LINHARES, A. C.; GABBAY, Y. B.; LIMA, C. S.; GUERRA, S. F.; SOARES, L. S.; OLIVEIRA, D. S.; LIMA, J. C.; MACEDO, O.; LEITE, J. P. Molecular characterization of VP4 and NSP4 genes from rotavirus strains infecting neonates and young children in Belem, Brazil. **Virus Research**, v. 126, p. 149–158, 2007b.

MASCARENHAS, J. D. P.; LINHARES, A. C.; GABBAY, Y. B.; LEITE, J. P. G. Detection and characterization of rotavirus G and P types from children participating in a rotavirus vaccine trial in Belém, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 113–117, 2002.

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

MASCARENHAS, J. D. P.; LINHARES, A. C.; BAYMA, A. P. G.; LIMA, J. C.; SOUSA, M. S.; ARAÚJO, I. T.; HEINEMANN, M. B.; GUSMÃO, R. H.P.; GABBAY, Y. B.; LEITE, J. P. G. Molecular Analysis of VP4, VP7, and NSP4 Genes of P[6]G2 Rotavirus Genotype Strains Recovered From Neonates Admitted to Hospital in Belém, Brazil. **J Medical Virology**, v. 78, p. 281- 289, 2006.

MATTHEW, B.; VENKATARAM, P. B. V. **Rotavirus Cell Entry**, In: JOHNSON, J. E., editor: Entry by Non-Enveloped Viruses, 2th Springer Berlin Heidelberg, p.121-148, 2010.

MATTHIJNSSENS, J.; CIARLET, M.; RAHMAN, M.; ATTOUI, H.; BANYAI, K.; ESTES, M. K.; GENTSCH, J. R.; ITURRIZA-GÓMARA, M.; KIRKWOOD, C. D.; MARTELLA, V.; MERTENS, P. P. C.; NAKAGOMI, O.; PATTON, J. T.; RUGGERI, F. M.; SAIF, L. J.; SANTOS, N.; STEYER, A.; TANIGUCHI, K.; DESSELBERGER, U.; VAN, R.M. Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. **Archives of Virology**, v. 153, p. 1621– 1629, 2008b.

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

MATTHIJNSSENS, J.; RAHMAN, M.; MARTELLA, V.; XUELEI, Y.; DE VOS, S.; DE LEENER, K.; CIARLET, M.; BUONAVOGLIA, C.; RANST, M.V. Full genomic analysis of human rotavirus strain B4106 and lapine rotavirus strain 30/96 provides evidence for interspecies transmission. **Journal of Virology**, v. 80, n. 8, p. 3801-3810, 2006.

MATTHIJNSSENS, J.; POTGIETER, C.A.; CIARLET, M.; PARREÑO, V.; MARTELLA, V.; BANYAI, K.; GARAICOECHEA, L.; PALOMBO, E.A.; NOVO, L.; ZELLER, M.; ARISTA, S.; GERNA, G.; RAHMAN, M.; RANST, M.V. - Are Human P[14] Rotavirus Strains the Result of Interspecies Transmissions from sheep or other Ungulates Belonging to the Mammalian Order of Artiodactyla. **Journal of Virology**, p. 3204-3219, 2009.

MAUNULA, L.; VON BONSDORFF, C.H. Short sequences define genetic lineages: phylogenetic analysis of group A rotaviruses based on partial sequences of genome segments 4 and 9. **Journal of General Virology**, v. 79, n. 2, p. 321-332, 1998.

MENDEZ, E.; ARIAS, C. F.; LOPEZ, S. Interactions between the two surface proteins of rotavirus may alter the receptor-binding specificity of the virus. **Journal of Virology**, v. 70, p. 1218-1222, 1996.

MERTENS, P. The dsRNA viruses. **Virus Research**, v. 101, n. 1, p. 3-13, 2004.

MIJATOVIC-RUSTEMPASIC, S.; BÁNYAI, K.; ESONA, M.D.; FOYTICH, K.; BOWEN, M. D.; GENTSCH, J. R. Genome sequence based molecular epidemiology of unusual US Rotavirus A G9 strains isolated from Omaha, USA between 1997 and 2000. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 11, n. 2, p. 522-527, 2011.

MILLER, M. A.; MCCANN, L. - Policy analysis of the use of hepatitis B, Haemophilus influenzae type b-, Streptococcus pneumoniae conjugate and rotavirus vaccines in national immunization schedules. **Journal of Health Economics**, v. 9, n. 1, p. 19-35, 2001.

MOCHIZUKI, M.; NAKAGOMI, O.; SHIBATA, S. Hemagglutinin activity of two distinct genogroups of cat and cat rotavirus strains. **Archives of Virology**, v. 122, p. 373-381, 1992.

MOCHIZUKI, M.; NAKAGOMI, T.; NAKAGOMI, O. Isolation from diarrheal and asymptomatic kittens of three rotavirus strains that belong to the AU-1 genogroup of human rotaviruses. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, p. 1272-1275, 1997.

MORILLO, G. S.; ADRIANA, L.; AUDREY, C.; FERNANDA F. C.; CARMONA R. C. C.; TIMENETSKY, C. Pós-Vacinação contra o rotavírus, Caracterização de genótipos de rotavírus in creches era pré:. **Journal of Pediatrics**, v. 86, n. 2, p. 155-158, 2010.

MOTA, J. A. C.; NORTON, R. C.; LEÃO, E. Diarréia aguda na infância. In; PENNA F.J.; MOTA J.A.C. **Doenças do aparelho digestivo na infância**. Rio de Janeiro, MEDSI, 1994. P. 342: 7-25.

MÜLLER, H.; JOHNE, R. - Rotaviruses: diversity and zoonotic potential- a brief review. **Wochenschr**, v. 120, p. 108-112, 2007.

MUKHERJEE, A.; DUTTA, D.; GHOSH, S.; BAGCHI, P.; CHATTOPADHYAY, S.; NAGASHIMA, S.; KOBAYASHI, N.; DUTTA, P.; KRISHNAN, T.; NAIK, T.N.; Chawla-Sarkar, M. Full genomic analysis of a human group A rotavirus G9P[6] strain from

Eastern India provides evidence for porcine-to-human interspecies transmission. **Archives of Virology**, v. 154, n. 5, p. 733-746, 2009.

NAKAGOMI, O.; ISEGAWA, Y.; HOSHINO, Y.; ABOUDY, Y.; SHIF, I.; SILBERSTEIN, I.; NAKAGOMI, T.; UEDA, S.; SEARS, J.; FLORES, J. A new serotype of the outer capsid protein VP4 shared by an unusual human rotavirus strain Ro1845 and canine rotaviruses. **Journal of General Virology**, v. 74, p. 2771–2774, 1993.

NAKAGOMI, O.; KAGA, E.; GERNA, G.; SARASINI, A.; NAKAGOMI, T. Subgroup I serotype 3 human rotavirus strains with long RNA pattern as a result of naturally occurring reassortment between members of the bovine and AU-1 genogroups. **Archives of Virology**, v. 126, p. 337–342, 1992.

NAKAGOMI, O.; KAGA, E. Distinctness of NSP1 gene of human rotavirus AU-1 from NSP1 gene of other human genogroups. **Research in Virology**, v. 146, n. 6, p. 423-428, 1995.

NAKAGOMI, O.; NAKAGOMI, T.; HOSHINO, Y.; FLORES, J.; KAPIKIAN, A.Z. Genetic analysis of a human rotavirus that belongs to subgroup I but has an RNA pattern typical of subgroup II human rotaviruses. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 25, p. 1159–1164, 1987.

NAKAGOMI, O.; NAKAGOMI, T. Genomic relationships among rotaviruses recovered from various animal species as revealed by RNA-RNA hybridization assays. **Research in Veterinary Science**, v. 73, p. 207–214, 2002.

NAKAGOMI, T.; NAKAGOMI, O. RNA-RNA hybridization identifies a human rotavirus that is genetically related to feline rotavirus. **Journal of Virology**, v. 63, p. 1431–1434, 1989.

OISHI, I.; KIMURA, T.; MURAKAMI, T.; HARUKI, K.; YAMAZAKI, K.; SETO, Y.; MINEKAWA, Y.; FUNAMOTO, H. Serial observations of chronic rotavirus infection in an immunodeficient child. **Microbiol Immunol.** v. 35, n. 11, p. 953-61, 1991.

OLIVEIRA, C. S.; GABBAY, Y. B.; ISHAK, R.; LINHARES, A. C. Infecções por rotavírus. In: FARHAT, Kalil Kairalla; CARVALHO, Luisa Helena Falheiros Rodrigues; SUCCI, Regina Célia de Menezes. **Infectologia pediátrica**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 1998. p. 394-413.

OLIVEIRA, C. S.; GABBAY, Y. B.; MASCARENHAS, J. D.; LINHARES, A. C. Infecções Por Rotavírus. In: FARHAT, Calil Kairalla; CARVALHO, Luisa Helena Falheiros Rodrigues; Succi, Regina Célia De Menezes. **infectologia pediátrica**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2007. p. 599-609.

O'RYAN, M.; PEREZ-SCHAEL, I.; MAMANI, N.; PENA, A.; SALINAS, B.; GONZALEZ, G.; GONZALEZ, F.; MATSON, D.O.; GOMEZ, J. Rotavirus-associated medical visits and hospitalizations in South America: a prospective study at three large sentinel hospitals. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 20, n. 7, p. 685-693, 2001.

PAGE, N. A.; STEELE, A. D. Antigenic and genetic characterization of serotype G2 human rotavirus strains from the African continent. *J Clin Microbiol.* v. 42, n. 2, p. 595- 600, 2004.

PAGER, C. T.; ALEXANDER, J. J.; STEELE, A. D. South African G4P[6] asymptomatic and symptomatic neonatal rotavirus strains differ in their NSP4, VP8*, and VP7 genes. **Journal of Clinical Microbiology**, v.62, n. 2, p. 208-216, 2000.

PALOMBO, E. A. Genetic analysis group A rotaviruses: evidence for interspecies transmission of rotavirus genes. **Virus Genes**, v. 24, p. 11–20, 2002.

PARASHAR, U. D.; GIBSON, C. J.; BRESSE, J. S.; GLASS, R. I. Rotavirus and severe childhood diarrhea. **Emerging Infectious Disease journal**, v. 12, n. 2, p. 304-306, 2006.

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

PARK, S. I. K; MATTHIJNSSENS, J.; SAIFC, L. J.; KIM, H. J.; PARK, J. G.; ALFAJARO, M. M.; KIM, D. S.; SON, K. Y.; YANG, D. K.; HYUN, B. H.; KANG, M. L.; CHO, K. O. Reassortment among bovine, porcine and human rotavirus strains results in G8P[7] and G6P[7] strains isolated from cattle in South Korea. **Veterinary Microbiology**, v. 152, n. 1-2, p. 55-66, 2011.

PARRA, G. I.; VIDALES, G.; GOMEZ, J. A.; FERNANDEZ, F. M.; PARREÑO, V.; BOK, K. Phylogenetic analysis of porcine rotavirus in Argentina: increasing diversity of G4 strains and evidence of interspecies transmission. **Veterinary Microbiology**, v. 126, p. 243-250, 2008.

PEREIRA, J. C. As escherichias causadoras de diarreias. **Boletim do Criadouro Campo das Caviúnas**, São Paulo, v. 3, 1-6, 2003.

RAHMAN, M.; MATTHIJNSSENS, J.; NAHAR, S.; PODDER, G.; SACK, D.A.; AZIM, T.; VAN RANST M. Characterization of a novel P[25],G11 human group A rotavirus. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 7, p. 3208-3212, 2005a.

RAHMAN, M. J.; MATTHIJNSSENS, X.; YANG, T.; DELBEKE, I.; ARIJS, K.; TANIGUCHI, M.; ITURRIZA-GOMARA, N.; IFTEKHARUDDIN, T.; AZIM, T.; VAN

RANST, M. Evolutionary history and global spread of the emerging G12 human rotaviruses. **Journal of Virology**, V. 81, p. 2382–2390, 2007.

RAHMAN, M.; SULTANA, R.; PODDER, G.; FARUQUE, A.S.; MATTHIJNSSENS, J.; ZAMAN, K.; BREIMAN, R.F.; SACK, D.A.; VAN RANST, M.; AZIM, T. Typing of human rotaviruses: nucleotide mismatches between the VP7 gene and primer are associated with genotyping failure. **Virology Journal**, v. 24, p. 2–24, 2005b.

RAMACHANDRAN, M.; GENTSCH, J.R.; PARASHAR, U.D.; JIN, S.; WOODS, P.A.; HOLMES, J.L.; KIRKWOOD, C.D.; BISHOP, R.F.; GREENBERG, H.B.; URASAWA, S.; GERNA, G.; COULSON, B.S.; TANIGUCHI K.; BRESEE J.S.; GLASS, R.I. Detection and characterization of novel rotavirus strains in the United States. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 11, p. 3223-3229, 1998.

RAMACHANDRAN, M.; DAS, B.K.; VIJ, A.; KUMAR, R.; BHAMBAL, S.S.; KESARI, N.; RAWAT, H.; BAHL, L.; THAKUR, S.; WOODS, P.A.; GLASS, R.I.; BHAN, M.K.; GENTSCH, J.R. Unusual diversity of human rotavirus G and P genotypes in India. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, p. 436–439, 1996.

RAMIG, R. F. Pathogenesis of intestinal and systemic rotavirus infection. **Journal of Virology**, V. 78, n. 19, p. 10213-10220, 2004.

RAMIG, R. F. Genetics of the rotaviruses. **Annual Review of Microbiology**, v. 51, p. 225-255, 1997.

RODRÍGUEZ-DÍAZ, J.; RUBILAR-ABREU, E.; SPITZNER, M.; HEDLUND, K.O.; LIPRANDI, F.; SVENSSON, L. Design of a multiplex nested PCR for genotyping of the NSP4 from group A rotavirus. **Journal of Virological Methods**, v. 149, p. 240–245, 2008.

ROMERO, C.; MAMANI, N.; HALVORSEN, K.; INIGUEZ, V. Enfermedades Diarreicas Agudas asociadas a Rotavirus. **Revista Chilena de Pediatría**, v. 78, n. 5, p. 549- 558, 2007.

SAITOH, Y.; MATSUNO, S.; MUKOYAMA, A. Exanthem subitum and rotavirus. **New England Journal of Medicine**, v. 304, n. 14, p. 845. 1981.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, p. 406–425, 1987.

SALVADOR, P. T; ALMEIDA, T.J ; ALVES, K. Y; DANTAS, C. N. The rotavirus disease and the oral human rotavirus vaccination in the Brazilian scenario: an integrative literature review. **Revista Ciência & Saúde Coletiva**, v. 16, n. 2, p. 567-574, 2011.

SÁNCHEZ-FAUQUIER, A.; MONTERO, V.; MORENO, S.; SOLÉ, M.; COLOMINA, J.; ITURRIZA-GÓMARA, M.; REVILLA, A.; WILHELMI, I.; GRAY, J. Human rotavirus G9 and G3 as major cause of diarrhea in hospitalized children, Spain. **Emerging Infectious Diseases journal**, v. 12, p. 1536–1541, 2006.

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

SATTAR, S. A.; JACOBSEN, H.; RAHMAN, H.; CUSACK, T. M.; RUBINO, J. R. Interruption of rotavirus spread through chemical disinfection. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 15, n. 12, p. 751-756, 1994.

SHAW, A. L.; ROTHANAGEL, R.; ZENG, C. Q. Y.; LAWTON, J. A.; RAMIG, R. F.; ESTES, M. K.; PRASAD, B. V. V. Rotavirus structure: interactions between the structural proteins. **Archives of Virology**, v. 12, p. 21-27, 1996.

SILVA, M. F. M. **Caracterização molecular dos genes de VP1, VP2, VP3, VP4 e VP7 de amostras de Rotavirus A genotipo G5P[8] circulando no Brasil entre 1986 e 2005.** (Dissertação de Mestrado) – Mestrado em Biologia Celular e Molecular – Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz. 2009. 117 f.

SONG, X. F.; HAO, Y. Adaptive evolution of rotavirus VP7 and NSP4 genes in different species. **Computational Biology and Chemistry**, v. 33, n. 4, p. 344-349, 2009.

SOUZA, E. C.; MARTINEZ, M. B.; TADDEI, C. R.; MUKAI, L.; GILIO, A. E.; RACZ, M. L.; SILVA, L.; EJZENBERG, B.; OKAY, Y. - Perfil etiológico das diarreias agudas de crianças atendidas em São Paulo. **Jornal de pediatria**, v. 78, n. 1, p. 31-38, 2002.

STEELE, A. D. E.; IVANOFF, B. Rotavirus strains circulating in Africa during 1996–1999: emergence of G9 strains and P[6] strains. **Vaccine**, v. 17, p. 361–367, 2003.

STEELE, A. D. E.; VAN NIEKERK, M. C.; MPHALELE, M. J. Geographic distribution of human rotavirus VP4 genotypes and VP7 serotypes in five South African regions. **Journal of Clinical Microbiology**, 33(6):1516-9, 1995.

SUBODH, S.; BHAN, M.K.; RAY, P. Genetic characterization of VP3 gene of group A rotaviruses. **Virus Genes**, V. 33, n. 2, 143-145, 2006.

TANIGUCHI, K.; URASAWA, T.; URASAWA, S. Species specificity and interspecies relatedness in VP4 genotypes demonstrated by VP4 sequence analysis of equine, feline, and canine rotavirus strains. **Virology**, v. 200, p. 390–400, 1994.

TARAPOREWALA, Z.; CHEN, D.; PATTON, J.T. Multimers formed by the rotavirus nonstructural protein NSP2 bind to RNA and have nucleoside triphosphatase activity. **Journal of Virology**, v. 73, p. 9934–9943, 1999.

TARAPOREWALA, Z. F.; PATTON, J. T. Nonstructural proteins involved in genome pack-aging and replication of rotaviruses and other members of the Reoviridae. **Virus Research**, p. 101-157, 2004.

TATE, J. E.; BURTON, A. H.; BOSCHI-PINTO, C.; STEELE, A. D.; DUQUE, J.; PARASHAR, U. D. 2008 estimate of worldwide rotavirus-associated mortality in children younger than 5 years before the introduction of universal rotavirus vaccination programmes: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet of Infectious Diseases**, v. 3099, p. 70253-70255, 2011.

TAVARES, T. D. E. M.; BRITO, W. M.; FIACCADORI, F. S.; FREITAS, E. R.; PARENTE, J. A.; COSTA, P. S.; GIUGLIANO, L. G.; ANDREASI, M. S.; SOARES, C. M.; CARDOSO, D. D. Molecular characterization of the NSP4 gene of human group A rotavirus samples from the West Central region of Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, p. 288–294, 2008.

TAYLOR, J. A.; BELLAMY, A. R. Interaction of the rotavirus nonstructural glycoprotein NSP4 with the viral and cellular components. **Viral gastroenteritis**. Desselberger U , Gray J, Elsevier Science, Amsterdam, The Netherlands, 2003. p.225-235.

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, p. 1377-1384, 2005.

TIMENETSKY, M.D.C.; SANTOS, N.; GOUVEA, V. Survey of rotavirus G and P types associated with human gastroenteritis in São Paulo, Brazil, from 1986 to 1992. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, p. 2622–2624, 1994.

TORT, L. F. C. **Caracterização molecular dos genes não estruturais NSP1, NSP3, NSP5 e estruturais VP4 e VP7 de Rotavírus A genotipo G9P[8] de diferentes estados do Brasil, 1998-2007.** (Dissertação de Mestrado) – Mestrado em Biologia Parasitária – Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz. 2009. 128 f.

TORT, L. F.; VOLOTÃO E. M.; DE MENDONÇA, M. C.; DA SILVA, M. F.; SIQUEIRA, A. A.; ASSIS, R. M.; MORATORIO, G.; CRISTINA, J.; LEITE, J. P. Phylogenetic analysis of human P[8]G9 rotavirus strains circulating in Brazil reveals the presence of a novel genetic variant. **Journal of Clinical Virology**, v. 47, n. 4, p. 345-355, 2010.

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

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

VARGHESE, V.; GHOSH, S.; DAS, S.; BHATTACHARYA, S.K.; KRISHNAN, T.; KARMAKAR, P.; KOBAYASHI, N.; NAIK, T.N. Characterization of VP1, VP2 and VP3 gene segments of a human rotavirus closely related to porcine strains. **Virus Genes**. v. 32, n. 3, 241-247, 2006.

VARSHNEY, B.; JAGANNATH, M. R.; VETHANAYAGAM, R. R.; KODHANDHARAMAN, S.; JAGANNATH, H. V.; GOWDA, K.; SINGH, D. K.; RAO, C. D. Prevalence of, and antigenic variation in, serotype G10 rotaviruses and detection of serotype G3 strains in diarrheic calves: implication for the origin of G10P11 or P11 type reassortant asymptomatic strains in newborn children in India. **Archives of Virology**, v. 147, p. 143–165, 2002.

VRANJAC, A. Diarréia e rotavírus. **Rev Saúde Pública, São Paulo**, v. 38, n. 6, 2004.

WANG, Y. H.; KOBAYASHI, N.; ZHOU, X.; NAGASHIMA, S.; ZHU, Z.R.; PENG, J. S.; LIU, M. Q.; HU, Q.; ZHOU, D. J.; WATANABE, S.; ISHINO, M. Phylogenetic analysis of rotaviruses with predominant G3 and emerging G9 genotypes from adults and children in Wuhan, China. **J Med Virol** v. 81, p. 382–389, 2009.

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

WEN, L.; NAKAYAMA, M.; YAMANISHI, Y.; NISHIO, O.; FANG, Z. Y.; NAKAGOMI, O.; ARAKI, K.; NISHIMURA, S.; HASEGAWA, A.; MUÈLLER, W.E.G.; USHIJIMA, H. Genetic variation in the VP7 gene of human rotavirus serotype 3 (G3 type) isolated in China and Japan. **Archives of Virology**, v. 142, p. 1481-1489, 1997.

World Health Organization. Rotavirus Vaccines. **Weekly Epidemiological Record**. v. 32, n. 82, p. 285–296, 2007.

YOLKEN, R.; MURPHY, M. Sudden infant death syndrome associated with rotavirus infection. **Journal of Medical Virology**, v. 10, n. 4, p. 291-6, 1982.

ZAHN, M.; MARSHALL, G.S. Clinical and epidemiological aspects of rotavirus infection. **Pediatric Annals**, v. 35, n. 1, p. 23-8, 2006.

ZHANG, M.; ZENG, C. Q.; DONG, Y.; BALL, J. M.; SAIF, L. J.; MORRIS, A. P.; ESTES, M. K. Mutations in rotavirus nonstructural glycoprotein NSP4 are associated with altered virus virulence. **Journal of Virology**, v. 72, p. 3666-3672, 1998.

ZHENG, B. J.; CHANG, R. X.; MA, G. Z.; XIE, J. M.; LIU, Q.; LIANG, X. R.; NG, M. H. Rotavirus infection of the oropharynx and respiratory tract in young children. **Journal of Medical Virology**, v. 34, n. 1, p. 29-37, 1991.

Apêndices

Apêndice I – Artigo aceito para publicação na revista Journal of Medical Virology

-----Mensagem original-----

De: onbehalfof+t.shennan+ucl.ac.uk@manuscriptcentral.com

[mailto:onbehalfof+t.shennan+ucl.ac.uk@manuscriptcentral.com] Em nome de t.shennan@ucl.ac.uk

Enviada em: sábado, 23 de junho de 2012 18:07

Para: Darleise de Souza Oliveira

Assunto: Journal of Medical Virology - Decision on Manuscript ID JMV-12-2994.R1

23-Jun-2012

Dear Miss Oliveira,

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "Phylogenetic analysis of probable non-human genes of group A rotaviruses isolated from children with acute gastroenteritis in Belém, Brazil" in its current form for publication in Journal of Medical Virology.

First Look NEW: Please note although the manuscript is accepted the files will now be checked to ensure that everything is ready for publication, and you may be contacted if final versions of files for publication are required.

A signed copyright transfer agreement is needed for publication. If you have not already provided one you should do so immediately. You can access the copyright transfer agreement at <http://www.wiley.com/go/ctaaus>

Please print the form, complete both sides and forward to the Production Editor, Mrs Lori Hamilton at: jmvprod@wiley.com in the United States. PLEASE ENSURE THAT YOUR MANUSCRIPT NUMBER IS INCLUDED ON THE CORRESPONDENCE.

You will receive your typeset proofs in due course.

Thank you for your fine contribution.

Kind regards,

Prof. Arie Zuckerman

Editor-in-Chief, Journal of Medical Virology t.shennan@ucl.ac.uk



Submit a Revision

Review the information below for correctness and make changes as needed. **After reviewing the manuscript proofs at the foot of this page, you MUST CLICK 'SUBMIT' to complete your submission.**



[View and Respond to Decision Letter](#)

[Save and Go Back](#) [Submit](#)



[Type, Title, & Abstract](#)

My Manuscript Information



[Attributes](#)

Step 1: View and Respond to Decision Letter [Edit](#)



[Authors & Institutions](#)

Response to Decision Letter:

Manuscript ID JMV-12-2994-Comments and Responses to Reviewers

We appreciate it very much the review made by Referees, and would like to inform that all suggestions were accepted and incorporated into the current version of the manuscript. Please see below our answers to comments.



[Details & Comments](#)

Reviewing 1
Questions and answers
Specific comments:

Page 3, line 60: Because not all RV strains encode NSP6 it would be more appropriate to say that the genome encodes 11 or 12 proteins depending on the strain. See refs. Estes & Kapikian, 2007, Fields Virology; Matthijnsens et al, Arch Virol 156:1397, 2011 and Gonzales et al, 1986 J Virol 57:110.

Answer: The new sentence was introduced as showed in page 3, line 64.

Page 3, line 65-66: Please correct the number of genotypes to: G27-P[35]-I16-R9-C9-M9-A16-N9-T12-E14-H11 and cite refs. Matthijnsens et al, Arch Virol 156:1397, 2011. Please, make sure that P genotypes are expressed in brackets.

Answer: The genotypes of rotavirus strains were updated in accordance with Matthijnsens et al., 2011 and showed in page 3, lines 70-71.

Page 3, line 77: ...Unusual genotypes arise from mixed infections... Has it been proven??? Is it the only mechanism??? For instance, can we say for sure that strains possessing G3P[9] genotype (common in cats and dogs) was generate in a mixed infection?

Answer: This sentence was rewrite as showed in page 3, lines 81-82.

Reviewing 2
Questions and answers
Specific comments:

Page 3, line 73. Specify that these strains are usual in humans.

Answer: These strains were specified as usual in humans in page 3, line 77-78.

Page 5, line 121. The amplified VP6 gene fragment is 376 bp. It should be mentioned here or elsewhere that this fragment is shorter (ie < 500 bp) than the recommended length suitable for genotype determination.

Answer: The amplified VP6 gene fragment of 376 bp that this fragment is shorter (ie < 500 bp) was mentioned in page 5, lines 133-135.

Figures. I could not open the VP7 tree for review.

Answer: Figure about the VP7 tree was reedited.

Editor's comments
Questions and answers

Please correct all split-infinitives (adjective/adverb should follow the verb), eg. "to molecularly characterize" should be "to characterize molecularly" and many others throughout the text.

Answer: The split-infinitives (adjective/adverb should follow the verb) was rewrite throughout the text as showed in page 2, line 34 and page 4, line 103.

✓ **Step 2: Type, Title, & Abstract**  Edit

Wiley - Manuscript type: Research Article

Title: Phylogenetic analysis of probable non-human genes of group A rotaviruses isolated from children with acute gastroenteritis in Belém, Brazil

Running Head: Human rotavirus strains with animal origins

Abstract: Rotaviruses (RVs) are the main cause of acute viral gastroenteritis in both humans and young animals of various species such as calves, horses, pigs, dogs, cats, and birds. The genetic diversity of RVs is related to a variety of evolutionary mechanisms, including point mutation and genome reassortment. The objective of this study was to characterize molecularly genes that encode structural and nonstructural proteins in unusual RV strains. The clinical specimens selected for this study were obtained from children and newborn with RV gastroenteritis, who participated in research projects on viral gastroenteritis conducted at the Evandro Chagas Institute. Structural (VP1-VP4, VP6, and VP7) and nonstructural (NSP1-NSP6) genes were amplified from stool samples by the polymerase chain reaction and subsequently sequenced. Eight unusual RV strains isolated from children and newborn with gastroenteritis were studied. Reassortment between genes of animal origin were observed in 5/8 (62.5%) strains analyzed. These results demonstrate that, although rare, interspecies (animal-human) transmission of RVs occurs in nature, as observed in the present study in strains NB150, HSP034, HSP180, HST327, and RV10109. This study is the first of its kind conducted in the Amazon region and supports previous data showing a close relationship between genes of human and animal origin, representing a challenge to the large-scale introduction of RV vaccines in national immunization programs.

Special Issue

req Is this submission for a special issue? No

✓ **Step 3: Attributes**  Edit

Keywords: diarrhoea*, rotavirus*, genetic and molecular diversity*

✓ **Step 4: Authors & Institutions**  Edit

1. Maestri, Régis; Evandro Chagas Institute, Virology
2. Kaiano, Jane Haruko; Evandro Chagas Institute, Virology
3. Neri, Darivaldo; Evandro Chagas Institute, Virology
4. Soares, Luana; Evandro Chagas Institute, Virology
5. Guerra, Sylvia; Evandro Chagas Institute, Virology
6. Oliveira, Darleise; Evandro Chagas Institute, Virology
7. Farias, Yasmin; Oswaldo Cruz Institute, Virology
8. Gabbay, Yvone; Evandro Chagas Institute, Virology
9. Leite, José Paulo; Oswaldo Cruz Institute, Virology
10. Linhares, Alexandre; Evandro Chagas Institute, Virology
11. Mascarenhas, Joana D'Arc; Evandro Chagas Institute, Virology Section

✓ **Step 5: Details & Comments**  Edit

Cover Letter:

1. Letter to Editor_Article JMV-12-2994.doc

Manuscript Details - Metadata (Please use numbers only)

Content Information

req Number of manuscript pages: 25
req Number of tables (use 0 for none): 2

Illustration Information

req Total number of figures (use 0 for none): 3
req Number of color figures (use 0 for none): 0

Submission Information - Confirm the following:

req Confirm that the manuscript has been submitted solely to this journal and is not published, in press, or submitted elsewhere. ✓
req I have prepared my paper and files in accordance with the journal's style and format requirements. ✓

Conflict of Interest

req Do you have any conflict of interest? No

If yes, please state:

req **Was the research described in your submission funded in whole or in part by the NIH, HHMI, and/or the Wellcome Trust?**

No

**Step 6: File Upload**

Edit

1. Article_Human rotavirus strains with animal origins resubmitted_JMV-12-2994.doc
2. Article_Table_Figures_Human rotavirus strains with animal origins_JMV-12-2994.doc

**Step 7: Review & Submit**

HTML PDF View MedLine Format

Save and Go Back Submit

ScholarOne Manuscripts™ v4.9.0 (patent #7,257,767 and #7,263,655). © ScholarOne, Inc., 2012. All Rights Reserved.
ScholarOne Manuscripts is a trademark of ScholarOne, Inc. ScholarOne is a registered trademark of ScholarOne, Inc.



Follow ScholarOne on Twitter

[Terms and Conditions of Use](#) - [ScholarOne Privacy Policy](#) - [Get Help Now](#)



Phylogenetic analysis of probable non-human genes of group A rotaviruses isolated from children with acute gastroenteritis in Belém, Brazil

Journal:	<i>Journal of Medical Virology</i>
Manuscript ID:	JMV-12-2994.R1
Wiley - Manuscript type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Maestri, Régis; Evandro Chagas Institute, Virology Kaiano, Jane Haruko; Evandro Chagas Institute, Virology Neri, Darivaldo; Evandro Chagas Institute, Virology Soares, Luana; Evandro Chagas Institute, Virology Guerra, Sylvia; Evandro Chagas Institute, Virology Oliveira, Darleise; Evandro Chagas Institute, Virology Farias, Yasmin; Oswaldo Cruz Institute, Virology Gabbay, Yvone; Evandro Chagas Institute, Virology Leite, José Paulo; Oswaldo Cruz Institute, Virology Linhares, Alexandre; Evandro Chagas Institute, Virology; Mascarenhas, Joana D'Arc; Evandro Chagas Institute, Virology Section
Keywords:	diarrhoea, rotavirus, genetic and molecular diversity

SCHOLARONE™
Manuscripts

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1 **Phylogenetic analysis of probable non-human genes of group A rotaviruses**
2 **isolated from children with acute gastroenteritis in Belém, Brazil**

3
4 **Shortened title: Human rotavirus strains with animal origins**

5
6 **Régis Piloni Maestri^a, Jane Haruko Lima Kaiano^a, Darivaldo Luz Neri^a, Luana da**
7 **Silva Soares^a, Sylvia de Fatima dos Santos Guerra^a, Darleise de Souza Oliveira^a,**
8 **Yasmin Nascimento Farias^b, Yvone Benchimol Gabbay^a, José Paulo Gagliardi**
9 **Leite^b, Alexandre da Costa Linhares^a, Joana D'Arc Pereira Mascarenhas^{a,*}**

10 ^a *Seção de Virologia, Instituto Evandro Chagas, Secretaria de Vigilância em Saúde,*
11 *Ministério da Saúde, Rodovia BR 316 – KM 07, S/N, Levilândia, 67.030-000,*
12 *Ananindeua, Pará, Brazil.*

13 ^b *Departamento de Virologia, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de*
14 *Janeiro, Brazil*

15
16 * Corresponding author: Tel: + 55 91 32142016; Fax + 55 91 32142006

17 E-mail address: joanamascarenhas@iec.pa.gov.br

18 E-mail authors: Régis Piloni Maestri (regismaestri@hotmail.com), Jane Haruko Lima

19 Kaiano (jkaiano@hotmail.com), Darivaldo Luz Neri (darivaldoneri@hotmail.com),

20 Luana da Silva Soares (luanasoares@iec.pa.gov.br), Sylvia de Fatima dos Santos

21 Guerra (sylviaaguerra@iec.pa.gov.br), Darleise S. Oliveira

22 (darleiseoliveira@iec.pa.gov.br), Yasmin Nascimento Farias

23 yasmin.farias@ioc.fiocruz.br, Yvone B. Gabbay (yvonegabbay@iec.pa.gov.br), José

24 Paulo G. Leite (jpgleite@ioc.fiocruz.br), Alexandre C. Linhares

25 (alexandrelinhares@iec.pa.gov.br)

26

27

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

28 **ABSTRACT**

29

30 Rotaviruses (RVs) are the main cause of acute viral gastroenteritis in both humans and
31 young animals of various species such as calves, horses, pigs, dogs, cats, and birds.

32 The genetic diversity of RVs is related to a variety of evolutionary mechanisms,
33 including point mutation and genome reassortment. The objective of this study was to

34 characterize molecularly genes that encode structural and nonstructural proteins in
35 unusual RV strains. The clinical specimens selected for this study were obtained from

36 children and newborn with RV gastroenteritis, who participated in research projects on
37 viral gastroenteritis conducted at the Evandro Chagas Institute. Structural (*VP1-VP4*,

38 *VP6*, and *VP7*) and nonstructural (*NSP1-NSP6*) genes were amplified from stool
39 samples by the polymerase chain reaction and subsequently sequenced. Eight unusual

40 RV strains isolated from children and newborn with gastroenteritis were studied.

41 Reassortment between genes of animal origin were observed in 5/8 (62.5%) strains
42 analyzed. These results demonstrate that, although rare, interspecies (animal-human)

43 transmission of RVs occurs in nature, as observed in the present study in strains
44 NB150, HSP034, HSP180, HST327, and RV10109. This study is the first of its kind

45 conducted in the Amazon region and supports previous data showing a close
46 relationship between genes of human and animal origin, representing a challenge to

47 the large-scale introduction of RV vaccines in national immunization programs.

48

49 **Key words:** diarrhoea, rotavirus, genetic and molecular diversity

50

51

52

53

54

55

56

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83

56 INTRODUCTION

57

58 Rotaviruses (RVs) are responsible for the death of an estimated 453,000
59 children under 5 years of age each year, i.e., one of every 260 children born each year
60 will die from RV diarrhea by their fifth birthday. Although the proportion of RV infection
61 among hospitalized children with diarrhea is higher in developed countries, most
62 deaths related to RVs occur in developing countries [Tate et al., 2011].

63 Rotaviruses are members of the *Reoviridae* family. Their genome consists of 11
64 double-strand RNA segments that encode 11 or 12 proteins depending on the strain.
65 The genetic diversity of RVs is related to a variety of evolutionary mechanisms,
66 including point mutation and genome reassortment [Estes and Kapikian, 2007].
67 Rotaviruses are currently classified into different genotypes based on the molecular
68 characteristics of the genes encoding VP7 - VP4 - VP6 - VP1 - VP2 - VP3 - NSP1 -
69 NSP2 - NSP3 - NSP4 - NSP5/6, designated Gx - P[x] - Ix - Rx - Cx - Mx - Ax - Nx - Tx -
70 Ex - Hx, respectively. At present, 27G, 35P, 16I, 9R, 9C, 9M, 16A, 9N, 12T, 14E and
71 11H genotypes have been described. This new classification permits a better
72 understanding of the function of each protein and of the evolutionary relationship
73 among species [Matthijnssens et al., 2011].

74 The binary combinations of GxP[x] genotypes tend to segregate according to
75 species-specific patterns in different animal species and are called usual and unusual
76 genotypes [Matthijnssens et al., 2008b; Ursu et al., 2009; Martella et al., 2010; Abe et
77 al., 2011; Iturriza-Gómara et al., 2011]. The usual genotypes in humans comprise
78 G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8] and G9P[8], which account for about 90% of RV
79 infections in the world, whereas the other combinations (unusual genotypes) are less
80 frequent, corresponding to only 4.9% of infections worldwide [Gentsch et al., 2005;
81 Santos and Hoshino, 2005; Iturriza-Gómara et al., 2011]. Among other mechanisms, it
82 seems likely that unusual genotypes may arise from mixed infections suggesting a
83 constant exchange of genetic material between human RV strains or between human

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

84 and animal strains [Mascarenhas et al., 2002; Santos and Hoshino, 2005;
85 Mascarenhas et al., 2007a; Iturriza-Gómara et al., 2011]. The new full genome-based
86 RV classification system therefore provides a better understanding of the complex
87 interactions between human and animal RVs, permitting the identification of
88 reassortment and transmission events between species and highlighting the role of
89 animals as a source of RV infection in humans [Matthijnssens et al., 2006, 2008b,
90 2009; Rahman et al., 2007; Tsugawa and Hoshino, 2008; Ghosh et al., 2010; Iturriza-
91 Gómara et al., 2011]. Matthijnssens et al. [2006] emphasized the importance of
92 evaluating the impact of vaccine-induced evolutionary pressure on RVs based on the
93 wide diversity of genotypes, which differ from those used in the two currently available
94 RV vaccines, and the potential of rapid viral evolution through genetic reassortment.

95 Studies conducted in Belém, Brazil, involving newborns and children with
96 diarrhea demonstrated similarity to the *VP4* and *NSP4* genes of porcine RV strains
97 [Mascarenhas et al., 2007a, b]. Da Silva et al. [2011] partially characterized the *VP1*,
98 *VP2* and *VP3* genes of Brazilian RV genotype G5P[8] and suggested that these genes
99 may have originated from porcine and human strains. These findings indicate that
100 monitoring circulating strains is important after introduction of RV vaccine mainly
101 country that has a highly unusual strain profile [Gentsch et al., 2009]. In this respect,
102 the emergence of unusual strains represents an important challenge for vaccine
103 effectiveness. The objective of the present study was to characterize molecularly the
104 genes that encode structural and nonstructural proteins in unusual RV strains isolated
105 from children and newborn with acute gastroenteritis in Belém, Brazil.

106
107
108
109
110
111

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

112 MATERIAL AND METHODS

113

114 Patients and clinical specimens

115 The clinical specimens selected for this study were obtained from newborn and
116 children with RV gastroenteritis, who participated in research projects on viral
117 gastroenteritis conducted at the Evandro Chagas Institute. **Table I** provides a brief
118 description of the project, age of the participants, number of unusual strains detected,
119 and origin (community-acquired or nosocomial) of these atypical RVs. More details of
120 the original studies can be found in the references indicated in the table.

121 The present investigation was approved by the Ethics Committee of the
122 Evandro Chagas Institute (No. 004/2011).

123

124 Viral RNA extraction and reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT- 125 PCR)

126 Viral RNA was extracted using guanidinium isothiocyanate-silica, as described
127 previously [Boom et al. 1990]. Structural and nonstructural genes were partially
128 amplified by RT-PCR as described by Varghese et al. [2006], Gentsch et al. [1992],
129 Iturriza-Gómara et al. [2002], Das et al. [1994], Gouvea et al. [1990], Nakagomi and
130 Kaga [1995], Mijatovic-Rustempasic et al. [2011], Matthijnsens et al. [2006], and
131 Cunliffe et al. [1997] for amplification of the *VP1* (686 bp), *VP2* (686 bp), *VP3* (702 bp),
132 *VP4* (876 bp), *VP6* (376 bp), *VP7* (904 and 1062 bp), *NSP1* (1565 bp), *NSP2* (1038
133 bp), *NSP3* (1062 bp), *NSP4* (738 bp), and *NSP5* (664 bp) genes. It is important to
134 mention that the amplified *VP6* gene fragment is shorter (ie < 500 bp) than
135 recommended length suitable for genotype determination.

136 The *VP7* gene was analyzed using the G1, G2, G3 and G4 RV classification
137 proposed by Jin et al. [1996], Page and Steele [2004], Bok et al. [2002], and
138 Matthijnsens et al. [2008a], respectively. For the *VP4* gene, genotypes P[4], P[6] and
139 P[9] were considered using the classification scheme proposed by Arista et al. [2005].

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

140 Martella et al. [2006] and Matthijnssens et al. [2008a], respectively. For the other
141 genes, the strains were classified into genotypes according to the cut-off values
142 proposed by Matthijnssens et al. [2008a].

143

144 **Nucleotide sequencing and phylogenetic analysis**

145 The amplified fragments were sequenced using the Big Dye Terminator Cycle
146 Sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) according to manufacturer
147 instructions. The sequences obtained were aligned and edited using the BioEdit
148 program, version 7.0.5.2 [Hall, 1999]. BLAST searches were performed to compare the
149 sequences with those of other RV strains available in the GenBank database
150 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Phylogenetic analysis was conducted using the MEGA v.
151 4.0 program. The dendrograms were constructed using the neighbor-joining method
152 [Saitou and Nei, 1987] and the Kimura two-parameter model [1980]. Reliability was
153 assessed by the nonparametric bootstrap test. It was not possible to sequence all
154 genes because of the lack of stool samples. The partial nucleotide sequences
155 determined in this study were deposited in GenBank under the accession numbers
156 JQ715624 to JQ715680 and JQ898157 to JQ898161.

157

158

159

160

161

162

163

164

165

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

166 **RESULTS**

167

168 Eight unusual RV strains were analyzed in the present study. Reassortment
169 between genes of animal origin were observed in 5/8 (62.5%) strains. **Table II**
170 summarizes the genetic relationship between these strains. Strains NSC206, 209 and
171 212 were included in the present analysis because they presented an atypical
172 distribution of the clusters upon polyacrylamide gel electrophoresis, showing a profile
173 similar to that described for avian RVs. However, analysis of the genes identified no
174 genes in these strains that would be suggestive of eventual exchange with RVs of
175 animal origin.

176 Analysis of the remaining RV strains revealed: a) one strain (RV10109) of
177 probable feline origin, with detection of genotype P[9]; b) two strains (NB150 and
178 HST327) presenting some gene characteristics of porcine RV; c) one strain (HSP180)
179 apparently possessing genes derived from bovine and porcine strains, and d) a fifth
180 strain (HSP034) presenting simultaneous gene characteristics of porcine and ovine RV.

181 In the analysis of the structural and nonstructural genes of RVs, emphasis was
182 given to strains carrying genes that were similar to those of animal origin. As can be
183 seen in **Figure 1A**, strain RV10109 of genotype G3 clustered with strains of human
184 and feline origin, showing similarity higher than 91%. In contrast, for genotype G4
185 strain HSP180 was clustered with the porcine strain (ArgP28).

186 For genotype P[6], strains NB150, HSP034 and HSP180 clustered into lineage
187 I, but could not be allocated to any of the sublineages proposed. The highest similarity
188 (> 91.6%) was observed to the porcine sublineage Ib strain (221/04). Strain HST327
189 could not be classified into any of the P[6] lineages and was more related (82%) to
190 porcine strain 221/04 (**Figure 1B**).

191 For genotype R1 of *VP1*, strains HST327 and NB150 clustered with strains of
192 porcine origin. Strain RV10109 clustered with genotype R2, together with the prototype

1
2
3 193 strains 30/96 (lapine origin), BA222 (feline origin) and MG6 (human origin), showing
4 194 similarity of 90.4%, 90.4% and 91.9%, respectively (**Figure 1C**).

5
6
7 195 For genotype C1 of *VP2*, strains HST327 and HSP180 presented similarity
8 196 higher than 90.7% with the bovine-porcine reassortant strain KJ75. The representative
9 197 strain of genotype C2 was RV10109, which clustered with the feline prototype strain
10 198 BA222, showing 98.8% similarity (**Figure 1D**).

11
12
13 199 For genotype M1 of *VP3*, strain HSP180 showed similarity of 94.1% to EC2184
14 200 (human-porcine origin) and of 91.8% to the porcine prototype strain OSU. Still for
15 201 genotype M1, strain NB150 clustered in a separate branch, showing similarity of 89.8%
16 202 to the human prototype strain (Wa), 89.2% to the porcine prototype strain (Gottfried),
17 203 and 85.7% to porcine strain HP140. In contrast, strain RV10109 formed a cohesive
18 204 group in genotype M2 with representative strains of human (PAH136), feline (BA222)
19 205 and bovine origin (WC3), showing similarity of 97.1%, 92.3% and 85.5%, respectively
20 206 (**Figure 2A**).

21
22
23 207 With respect to nonstructural genes, strain RV10109, genotype A3 of *NSP1*,
24 208 clustered (bootstrap value of 100%) with the feline prototype strain (BA222) and the
25 209 human prototype strain (PAH136), showing similarity of 97.3% and 93%, respectively.
26 210 On the other hand, strain NB150 clustered with human strain BE00048 whereas
27 211 HST327 with porcine strain (RU172) in genotype A1. The strain HSP180 clustered with
28 212 porcine strain Gottfried (bootstrap de 100) in genotype A8 (**Figure 2B**).

29
30
31 213 Regarding *NSP2*, strain RV10109 clustered in genotype N1, showing 98%
32 214 similarity to the feline prototype strain BA222. These strains formed a cohesive group
33 215 as indicated by a bootstrap value of 100% (**Figure 2C**).

34
35
36 216 For genotype T1 of *NSP3*, strains HST327 and NB150 formed a cohesive group
37 217 with the human-porcine strain EC2184, which was supported by a bootstrap value of
38 218 100%. In contrast, strain HSP180 clustered in genotype T7 (bootstrap value of 100%)
39 219 with the bovine prototype strain UK (**Figure 2D**).

1
2
3 220 Analysis of the *NSP4* gene showed that strains NB150, HST327, HSP180 and
4
5 221 HST034 formed a cohesive group and clustered in genotype E1 together with the
6
7 222 porcine strain OSU. In contrast, strain RV10109 (genotype E3) grouped to the feline
8
9 223 strain KF17 (**Figure 3A**).

10
11 224 For genotype H3 of *NSP5*, strain RV10109 clustered with the feline strain
12
13 225 BA222 (bootstrap value of 100%), showing 98.9% similarity. In contrast, strains NB150
14
15 226 and HST327 (genotype H1) showed similarity of 97.4% and 98.5%, respectively, to the
16
17 227 porcine prototype strain Gottfried. Strain HSP180 was closely related (95.4%) to strain
18
19 228 RMC321 (**Figure 3B**).

20
21 229
22
23 230
24
25 231
26
27 232
28
29 233
30
31 234
32
33 235
34
35 236
36
37 237
38
39 238
40
41 239
42
43 240
44
45 241
46
47 242
48
49 243
50
51 244
52
53 245
54
55 246
56
57 247
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

248 **DISCUSSION**

249

250 The present study supports the hypothesis of a dynamic interaction between
251 RVs that infect humans and animals such as cattle, pigs, cats and dogs, indicating a
252 constant flow of genetic material between human and animal strains and that animal
253 RVs can cross the species barrier and cause gastroenteritis in humans [Isegawa et al.,
254 1992; Li et al., 1993; Nakagomi et al., 1993; Palombo, 2002; Laird et al., 2003; Khamrin
255 et al., 2006; Matthijnssens et al., 2006; 2008b; Banerjee et al., 2007; De Grazia et al.,
256 2007].

257 In the study of Gusmão et al. [1994] on nosocomial infection, strains NSC206,
258 NSC209 and NSC212 were isolated from children younger than 2 years who were
259 hospitalized with acute gastroenteritis in Belém, Brazil. The authors identified an
260 atypical electropherotype of group A RVs (5-1-3-2) which was characteristic of avian
261 strains, suggesting a possible transmission between species. However, analysis of all
262 genes revealed no genes suggestive of eventual exchange with animal RVs.

263 Strain NB150 was isolated in 1997 from a newborn with community-acquired
264 mild/moderate diarrhea. The child lived at the periphery of Belém, Brazil, under
265 precarious sanitary conditions and in contact with domestic animals, including pigs
266 [Linhares et al., 2002]. A subsequent study demonstrated that the *VP4* and *NSP4*
267 genes of this strain were closely related to porcine genes [Mascarenhas et al., 2007a].
268 In the present investigation, genes *VP1*, *NSP3* and *NSP5* were also of porcine origin
269 and genes *VP7*, *VP6*, *VP2* and *NSP1* were closely related to those of human strains.
270 The origin of the *VP3* gene could not be determined. Analysis of the *NSP3* gene in
271 strain NB150 and of the *NSP4* gene in HSP034, HST327 and HSP180 showed that the
272 strains clustered in the same branch of the tree as RMC321, thus demonstrating the
273 porcine origin of genes in the RV strains from Belém [Varghese et al., 2004, 2006].
274 Strain N150 showed 97% and 98.7% similarity to the *VP1* and *NSP3* genes of strain
275 EC2184, respectively. Bányai et al. [2009] identified human-porcine reassortment

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

276 events in the *VP1*, *VP2*, *VP3*, *VP4*, *NSP1*, *NSP4* and *NSP5* genes of strain EC2184.
277 However, the genetic relationship of the *NSP3* gene could not be established, although
278 it was more related to the reassortant strain than to the human strain.

279 As previously described by Mascarenhas et al. [2007b], analysis of genotype
280 P[6] of the *VP4* gene in strains HSP180, HSP034 and NB150 showed that these
281 strains clustered into lineage I, but they could not be allocated to any of the
282 sublineages proposed. However, there was strong evidence that these strains belong
283 to sublineage Ib of porcine origin. Studying a child with diarrhea hospitalized in Italy,
284 Martella et al. [2008] confirmed the clustering of NB150 into lineage I, sublineage Ie.

285 Strain HST327 was isolated in 1999 from a child with diarrhea and the *VP4* and
286 *NSP4* gene were the first genes analyzed by Mascarenhas et al. [2007b]. The authors
287 characterized the *VP4* gene to be of porcine origin and the *NSP4* gene was found to
288 belong to genotype B. The genotype constellation identified in the present study was
289 G4-P[6]-I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1 and analysis of the *VP1*, *VP2*, *VP4*, *NSP1*,
290 *NSP3*, *NSP4* and *NSP5* genes showed that the strain clustered with a porcine
291 prototype strain.

292 For genotype C1 of the *VP2* gene, strains HST327 and HSP180 clustered with
293 strain KJ75 of bovine origin. Park et al. [2011] showed that strain KJ75 isolated from
294 bovine, curiously had only the genotype P[5] of bovine origin, while others genes
295 including *VP2* were of swine origin. Thus the *VP2* gene of the samples HST327 and
296 HSP180 grouped with samples of bovine origin possessed the *VP2* segment of
297 similarity with swine.

298 Analysis of the *NSP3* gene revealed 95.5% similarity of strain HST327 to
299 EC2184. However, the genetic relationship of the *NSP3* gene of this strain was
300 confusing, although the gene was more related to strains undergoing porcine-human
301 reassortment than to genes of human RVs [Bányai et al., 2009]. However, strain
302 HST327 presented similarity of 88.3% (*NSP3* gene) and 92.9% (*NSP2* gene) to strain
303 RMC321 analyzed by Varghese et al. [2004, 2006]. Almost all genes of the latter strain

1
2
3 304 were similar to those of porcine RVs, except for *VP7*, a finding supporting the possible
4
5 305 relationship between the *NSP3* and *NSP2* genes of strain HST327 and porcine genes.

6
7 306 Strain HSP034 possessed the G2-P[6]-R2-C2-M2-A2-T2-E1-H2 genotype
8
9 307 constellation and only the *VP4* (P[6]) and *NSP4* (E1) genes were similar to genes of
10
11 308 porcine origin, whereas the *VP7*, *VP1*, *VP2*, *VP3*, *NSP1*, *NSP3* and *NSP5* genes
12
13 309 presented homology with human genes. When the *VP1* gene was analyzed, this strain
14
15 310 clustered in genotype R2 together with the human prototype strain L26 and ovine RV
16
17 311 strain OVR762. Matthijssens et al. [2009] characterized genotype R2 of strain
18
19 312 OVR762 as not very conserved and demonstrated that this strain is strongly related to
20
21 313 strains of human origin (MG6, Hun5). Conclude that the *VP1* gene of HSP034 is a
22
23 314 gene of predominantly human origin when compared to the other samples.

24
25 315 Strain HSP180 presented the G4-P[6]-I1-R1-C1-M1-A8-N1-T7-E1-H1 genotype
26
27 316 constellation. Genes *VP7*, *VP4*, *VP2*, *VP3*, *NSP1*, *NSP4* and *NSP5* were similar to
28
29 317 those of porcine RV strains, *NSP3* to those of bovine strains, and *VP6*, *VP1* and *NSP2*
30
31 318 to those of human strains. For genotype G4, this strain clustered into lineage VII,
32
33 319 sublineage VIIc, which includes genotype G4P[6] of porcine origin described by Parra
34
35 320 et al. [2008].

36
37 321 In a study of strain R479 isolated from a 2-year-old child with diarrhea, Wang et
38
39 322 al. [2010] characterized genes *VP1-VP4*, *VP6*, *NSP1*, *NSP4* and *NSP5* to be related to
40
41 323 those of porcine RV strains or porcine-human reassortant strains, whereas *NSP3* (T7)
42
43 324 was similar to the bovine gene, suggesting that R479 is a recombinant virus. This strain
44
45 325 presented 88.8% similarity to HSP180, clustering it in bovine genotype T7 with the
46
47 326 bovine prototype strain UK (G5P[5]). This finding supports the hypothesis that strain
48
49 327 HSP180 is a recombinant virus.

50
51 328 Strain RV10109 was isolated in 2006 from a child with diarrhea and was
52
53 329 assigned to genotypes G3-P[9]-R2-C2-M2-A3-N1-T3-E3-H3. Genes *VP7*, *VP2*, *NSP1*,
54
55 330 *NSP2*, *NSP4* and *NSP5* were closely related to those of feline RVs and *VP4* and *NSP3*
56
57 331 to those of human strains, whereas the origin of *VP1* and *VP3* could not be determined.
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

332 In addition, genotype G3 of this strain clustered with Australian Cat2/ G3P[9] strains
333 isolated from an asymptomatic cat [Birch et al., 1985]. Although there are few reports
334 on feline RVs, Birch et al. [1985], Gouvea et al. [1994], Taniguchi et al. [1994] and
335 Mochizuki et al. [1997] demonstrated that all feline RV strains present genotype G3P[3]
336 or G3P[9]. In the United States, genotype G3P[9] is rarely detected, with an average of
337 one case per year [Griffin et al., 2000; Hull et al., 2011].

338 It is believed that human RV strains belonging to genotype G3, combined with
339 P[3] or P[9], originated by direct transmission from dogs or cats to humans [Li et al.,
340 1993; Nakagomi and Nakagomi, 2002; Tsugawa and Hoshino, 2008]. Human and
341 feline G3P[9] RV strains are very similar when compared to bovine and canine strains,
342 a fact suggesting that these strains have evolved from multiple reassortment involving
343 different hosts and species [Mochizuki et al., 1992; Gollop et al., 1998; Cao et al.,
344 1999; Griffin et al., 2002; Nakagomi and Nakagomi, 2002; Tsugawa and Hoshino,
345 2008; Wang et al., 2009]. Genes *VP7*, *VP2*, *NSP1*, *NSP2* and *NSP5* of strain RV10109
346 were similar to feline genes. These results agree with the findings of Tsugawa and
347 Hoshino [2008] who demonstrated a close relationship between human G3P[3] strains
348 (Ro1845 and HCR3A) and a feline strain (Cat97).

349 Studies have demonstrated that, although rare, interspecies transmission
350 (animal-human) of RVs occurs in nature. This interspecies transmission probably had
351 occurred in the NB150, HSP034, HSP180, HST327 and RV10109 strains studied here,
352 in which reassortment events were observed in 62.5% of cases.

353 In summary, this study is the first of its kind conducted in the Amazon region
354 and demonstrates the circulation of unusual RV strains of probable feline, porcine,
355 bovine and recombinant porcine-bovine origin in children and newborn with acute
356 diarrhea from Belém, northern Brazil. These findings are important within the current
357 scenario of post-RVs vaccine introduction in various countries, particularly Latin
358 America, because of the eventual emergence of vaccine-resistant strains (escape

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

359 mutants), which represent a challenge to the large-scale introduction of vaccines in
360 national immunization programs.

361

362 **Acknowledgements**

363 This study has received financial support by a grant from The National Council for
364 Scientific and Technological Development (CNPq), Brasília, Federal District, Brazil, no.
365 4742742008-0 and from the Evandro Chagas Institute /SVS/MS/Brazil. Régis Piloni
366 Maestri, Jane Haruko Lima Kaiano and, Yasmin Nascimento Farias received a Grant
367 fellowship from CNPq. Darivaldo Luz Neri and Sylvia de Fatima dos Santos Guerra
368 received a Grant fellowship from the Coordination for the Improvement of Higher
369 Education Personnel (CAPES). We gratefully acknowledge the valuable technical
370 support provided by Mrs. Euzeni Maria de Fátima Menezes.

371

372

373

374

375

376

377

378

379

380

381

382

383

384

385

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

386 **References**

387

388 Abe M, Ito N, Masatani T, Nakagawa K, Yamaok S, Kanamaru Y, Suzuki H,
389 Shibano K, Arashi Y, Sugiyama M. 2011. Whole genome characterization of new
390 bovine rotavirus G21P[29] and G24P[33] strains provides evidence for interspecies
391 transmission. *J Virol* 92:952-960.

392

393 Arista S, Giammanco GM, Grazia SD, Colomba C, Martella V. 2005. Genetic
394 variability among G4 Italian human rotaviruses. *J Clin Microbiol* 43:1420-1425.

395

396 Banerjee I, Iturriza-Gómara M, Rajendran P, Primrose B, Ramani S, Gray JJ,
397 Brown DW, Kang G. 2007. Molecular characterization of G11P[25] and G3P[3]
398 human rotavirus strains associated with asymptomatic infection in South India. *J*
399 *Med Virol* 79:1768-1774.

400

401 Bányai K, Esona MD, Kerin TK, Hull JJ, Mijatovic S, Vascónez N, Torres C, Filippis
402 AMB, Gentsch JR. 2009. Molecular characterization of a rare, human-porcine
403 reassortant rotavirus strain, G11P[6], from Ecuador. *Arch Virol* 154:1823-1829.

404

405 Birch CJ, Heath RL, Marshall JA, Liu S, Gust ID. 1985. Isolation of feline
406 rotaviruses and their relationship to human and simian isolates by electropherotype
407 and serotype. *J Gen Virol* 66:2731-2735.

408

409 Bok K, Matson DO, Gómez JA. 2002. Genetic variation of capsid protein VP7 in
410 genotype G4 human rotavirus strains: simultaneous emergence and spread of
411 different lineages in Argentina. *J Clin Microbiol* 40:2016-2022.

412

1	
2	
3	413 Boom R, Sol CJA, Salimans MMM, Jansen CL, Wertheim-Van Dillen PME, Van Der
4	
5	414 Noordaa J. 1990. Rapid and simple method for purifications of nucleic acids. <i>J Clin</i>
6	
7	415 <i>Microbiol</i> 28: 495-503.
8	
9	416
10	
11	417 Cao XR, Akihara S, Fang ZY, Nakagomi O, Ushijima H. 1999. Genetic variation in
12	
13	418 the VP4 and NSP4 genes of human rotavirus serotype 3 (G3 type) isolated in
14	
15	419 China and Japan. <i>Microbiol Immunol</i> 43:171–175.
16	
17	420
18	
19	421 Cunliffe NA, Woods PA, Leite JPG, Das BK, Ramachandran M, Bhan MK, Hart CA,
20	
21	422 Glass RI, Gentsch JR. 1997. Sequence analysis of NSP4 gene of human rotavirus
22	
23	423 allows classification into two main genetic groups. <i>J Med Virol</i> 53:41-50.
24	
25	424
26	
27	425 Da Silva MF, Tort LF, Gómez MM, Assis RM, De Mendonça MC, Volotão EDEM,
28	
29	426 Leite JP. 2011. Phylogenetic analysis of VP1, VP2, and VP3 gene segments of
30	
31	427 genotype G5 group A rotavirus strains circulating in Brazil between 1986 and 2005.
32	
33	428 <i>Virus Res</i> 160:381-388.
34	
35	429
36	
37	430 Das BK, Gentsch JR, Cicirello HG, Woods PA, Ramachandran M, Gupta A,
38	
39	431 Ramachandran M, Kumar R, Bhan MK, Glass RI. 1994. Characterization of
40	
41	432 rotavirus strains from newborns in New Delhi, India. <i>J Clin Microbiol</i> 32:1820-1822.
42	
43	433
44	
45	434 De Grazia S, Martella V, Giammanco GM, Gòmara MI, Ramirez S, Cascio A,
46	
47	435 Colomba C, Arista S. 2007. Canine-origin G3P[3] rotavirus strain in child with acute
48	
49	436 gastroenteritis. <i>Emerg Infect Dis</i> 13:1091–1093.
50	
51	437
52	
53	438 Estes MK, Kapikian AZ. Rotaviruses. In: Knip DM, Howley PM. (Eds). <i>Fields</i>
54	
55	439 <i>Virology</i> , 5 th ed. Lippincott William and Wilkins. Philadelphia, 2007, p. 1917-1974.
56	
57	440
58	
59	
60	

- 1
2
3 441 Gentsch JR, Laird AR, Bielfelt B, Griffin DD, Banyai K, Ramachandran M, Jain V,
4
5 442 Cunliffe NA, Nakagomi O, Kirkwood CD, Fischer TK, Parashar UD, Bresee JS,
6
7 443 Jiang B, Glass R. 2005. Serotype diversity and reassortment between human and
8
9 444 animal rotavirus strains: implications for rotavirus vaccine programs. *J Infect Dis*
10
11 445 1:146-1159.
12
13 446
14
15 447 Gentsch J, Glass RI, Wiids P, Gouvea V, Gorzlia M, Flores J, Das BK, Bhan MK.
16
17 448 1992. Identification of group A rotavirus gene 4 types by Polymerase Chain
18
19 449 Reaction. *J Clin Microbiol* 30:1365-1373.
20
21 450
22
23 451 Gentsch JR, Parashar UD, Glass RI. 2009. Impact of rotavirus vaccination: the
24
25 452 importance of monitoring strains. *Future Microbiol* 4:1231-1234.
26
27 453
28
29 454 Ghosh S, Kobayashi N, Nagashima S, Chawla-Sarkar M, Krishnan T, Ganesh B,
30
31 455 Naik TN. 2010. Full genomic analysis and possible origin of a porcine G12 rotavirus
32
33 456 strain RU172. *Virus Genes* 40:382-388.
34
35 457
36
37 458 Gollop R, Nakagomi O, Silberstein I, Shulman LM, Greenberg HB, Mendelson E.
38
39 459 1998. Shif, I. Three forms of AU-1 like human rotaviruses differentiated by their
40
41 460 overall genomic constellation and by the sequence of their VP8*. *Arch Virol*
42
43 461 143:263– 277.
44
45 462
46
47 463 Gouvea V, Glass RI, Wood P, Taniguchi K, Clark FH, Forrester B, Fang ZY. 1990.
48
49 464 Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from
50
51 465 stool specimens. *J Clin Microbiol* 28:276-282.
52
53 466
54
55 467 Gouvea V, Santos N. 1994. Rotavirus serotype G5: An emerging cause of epidemic
56
57 468 childhood diarrhoea. *Vaccine* 17:1291-1292.
58
59
60

- 1
2
3 469 Gusmão RHP, Mascarenhas JDP, Gabbay YB, Linhares AC. 1994. Nosocomial
4
5 470 transmission of an avian-like rotavirus strain among children in Belém, Brazil. J
6
7 471 Diarrhoeal Dis Res 12:129-132.
8
9 472
10
11 473 Griffin DD, Kirkwood CD, Parashar UD, Woods PA, Bresee JS, Glass RI, Gentsch
12
13 474 JR. 2000. Surveillance of rotavirus strains in the United States: identification of
14
15 475 unusual strains. The National Rotavirus Strain Surveillance System collaborating
16
17 476 laboratories. J Clin Microbiol 38:2784–2787.
18
19 477
20
21 478 Griffin DD, Nakagomi T, Hoshino Y, Nakagomi O, Kirkwood CD, Parashar UD,
22
23 479 Glass RI, Gentsch JR. 2002. Characterization of nontypeable rotavirus strains from
24
25 480 the United States: identification of a new rotavirus reassortant (P2A[6],G12) and
26
27 481 rare P3[9] strains related to bovine rotaviruses. Virology 294:256-269.
28
29 482
30
31 483 Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and
32
33 484 analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl Acids Symp 41:95-98.
34
35 485
36
37 486 Hull JJ, Teel EN, Kerin TK, Freeman MM, Esona MD, Gentsch JR, Cortese MM,
38
39 487 Parashar UD, Glass RI, Bowen MD. 2011. United States rotavirus strain
40
41 488 surveillance from 2005 to 2008: genotype prevalence before and after vaccine
42
43 489 introduction. Pediatr Infect Dis J 30:S42–S47.
44
45 490
46
47 491 Isegawa Y, Nakagomi O, Nakagomi T, Ueda S. 1992. A VP4 sequence highly
48
49 492 conserved in human rotavirus strain AU-1 and feline rotavirus strain FRV-1. J Gen
50
51 493 Virol 73:1939–1946.
52
53 494
54
55 495 Iturriza-Gómara M, Dallman T, Bányai K, Böttiger B, Buesa J, Diedrich S, Fiore L,
56
57 496 Johansen K, Koopmans M, Korsun N, Koukou D, Kroneman A, László B,
58
59
60

- 1
2
3 497 Lappalainen M, Maunula L, Marques AM, Matthijnssens J, Midgley S, Mladenova Z,
4
5 498 Nawaz S, Poljsak-Prijatelj M, Pothier P, Ruggeri FM, Sanchez-Fauquier A, Steyer
6
7 499 A, Sidaraviciute-Ivaskeviciene I, Syriopoulou V, Tran AN, Usonis V, Van Ranst M,
8
9 500 De Rougemont A, Gray J. 2011. Rotavirus genotypes co-circulating in Europe
10
11 501 between 2006 and 2009 as determined by EuroRotaNet, a pan-European
12
13 502 collaborative strain surveillance network. *Epidemiol Infect* 139:895-909.
14
15 503
16
17 504 Iturriza-Gómara M, Wong C, Blome S, Desselberger U, Gray J. 2002. Molecular
18
19 505 characterization of VP6 genes of human rotavirus isolates: correlation of
20
21 506 genogroups with subgroups and evidence of independent segregation. *J Virol*
22
23 507 76:6596-6601.
24
25 508
26
27 509 Jin Q, Ward RL, Knowlton DR, Gabbay YB, Linhares AC, Rappaport R, Woods PA,
28
29 510 Glass RI, Gentsch JR. 1996. Divergence of VP7 genes of G1 rotaviruses isolated
30
31 511 from infants vaccinated with reassortant rhesus rotaviruses. *Arch Virol* 141:2057-
32
33 512 2076.
34
35 513
36
37 514 Khamrin P, Maneekarn N, Peerakome S, Yagyu F, Okitsu S, Ushijima H. 2006.
38
39 515 Molecular characterization of a rare G3P[3] human rotavirus reassortant strain
40
41 516 reveals evidence for multiple human-animal interspecies transmissions. *J Med Virol*
42
43 517 78:986-994.
44
45 518
46
47 519 Kimura MA. 1980. Simple method for estimating evolutionary rate of base
48
49 520 substitution through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol*
50
51 521 16:111-120.
52
53 522
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 523 Laird AR, Ibarra V, Ruiz-Palacios G, Guerrero ML, Glass RI, Gentsch JR. 2003.
4
5 524 Unexpected detection of animal VP7 genes among common rotavirus strains
6
7 525 isolated from children in Mexico. *J Clin Microbiol* 41:4400–4403.
8
9 526
10
11 527 Li B, Clark HF, Gouvea V. 1993. Nucleotide sequence of the VP4-encoding gene of
12
13 528 an unusual human rotavirus (HCR3). *Virology* 196:825–830.
14
15 529
16
17 530 Linhares AC, Mascarenhas JDP, Gusmão RHP, Gabbay YB, Fialho AM, Leite JPG.
18
19 531 2002. Neonatal rotavirus infection in Belém, northern Brazil: nosocomial
20
21 532 transmission of a P[6]G2 strain. *J Med Virol* 67:418–426.
22
23 533
24
25 534 Martella V, Colombrita D, Lorusso E, Draghin E, Fiorentini S, De Grazia S, Bányai
26
27 535 K, Ciarlet M, Caruso A, Buonavoglia C. 2008. Detection of a porcine-like rotavirus
28
29 536 in a child with enteritis in Italy. *J Clin Microbiol* 46:3501-3507.
30
31 537
32
33 538 Martella V, Bányai K, Matthijnssens J, Buonavoglia C, Ciarlet M. 2010. Zoonotic
34
35 539 aspects of rotaviruses. *Vet Microbiol* 246-255.
36
37 540
38
39 541 Martella V, Ciarlet M, Banyai K, Lorusso E, Cavalli A, Corrente M, Elia G, Arista S,
40
41 542 Camero M, Desario C, Decaro N, Lavazza A, Buonavoglia C. 2006. Identification of
42
43 543 a novel VP4 genotype carried by a serotype G5 porcine rotavirus strain. *Virology*
44
45 544 346:301-311.
46
47 545
48
49 546 Mascarenhas JDP, Leite JPG, Lima JC, Heinemann MB, Oliveira DS, Araújo IT,
50
51 547 Soares LS, Gusmão RHP, Gabbay YB, Linhares AC. 2007a. Detection of a
52
53 548 neonatal human rotavirus strain with VP4 and NSP4 genes of porcine origin. *J Med*
54
55 549 *Microbiol* 56:524-532.
56
57 550
58
59
60

1		
2		
3	551	Mascarenhas JD, Linhares AC, Gabbay YB, Lima CS, Guerra SF, Soares LS,
4		
5	552	Oliveira DS, Lima JC, Macedo O, Leite JP. 2007b. Molecular characterization of
6		
7	553	VP4 and NSP4 genes from rotavirus strains infecting neonates and young children
8		
9	554	in Belem, Brazil. <i>Virus Res</i> 126:149–158.
10		
11	555	
12		
13	556	Mascarenhas JDP, Linhares AC, Gabbay YB, Leite JPG. 2002. Detection and
14		
15	557	characterization of rotavirus G and P types from children participating in a rotavirus
16		
17	558	vaccine trial in Belém, Brazil. <i>Mem Inst Oswaldo Cruz</i> 97:113–117.
18		
19	559	
20		
21	560	Matthijnssens J, Ciarlet M, Heiman E, Arijs I, Delbeke T, McDonald SM, Palombo
22		
23	561	EA, Iturriza-Gómara M, Maes P, Patton JT, Rahman M, Van Ranst M. 2008a. Full
24		
25	562	genome-based classification of rotaviruses reveals a common origin between
26		
27	563	human Wa-Like and porcine rotavirus strains and human DS-1-like and bovine
28		
29	564	rotavirus strains. <i>J Virol</i> 82:3204–3219.
30		
31	565	
32		
33	566	Matthijnssens J, Ciarlet M, McDonald SM, Attoui H, Banyai K, Brister JR, Buesa J,
34		
35	567	Esona MD, Estes MK, Gentsch JR, Iturriza-Gómara M, Johne R, Kirkwood CD,
36		
37	568	Martella V, Mertens PP, Nakagomi O, Parreño V, Rahman M, Ruggeri FM, Saif LJ,
38		
39	569	Santos N, Steyer A, Taniguchi K, Patton JT, Desselberger U, Van Ranst M. 2011.
40		
41	570	Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification
42		
43	571	Working Group (RCWG). <i>Arch Virol</i> 156:1397-1413.
44		
45	572	
46		
47	573	Matthijnssens J, Ciarlet M, Rahman M, Attoui H, Banyai K, Estes MK, Gentsch JR,
48		
49	574	Iturriza-Gómara M, Kirkwood CD, Martella V, Mertens PPC, Nakagomi O, Patton
50		
51	575	JT, Ruggeri FM, Saif LJ, Santos N, Steyer A, Taniguchi K, Desselberger U, Van
52		
53	576	RM. 2008b. Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all
54		
55	577	11 genomic RNA segments. <i>Arch Virol</i> 153:1621–1629.
56		
57	578	
58		
59		
60		

1
2
3 579 Matthijnssens J, Potgieter CA, Ciarlet M, Parreño V, Martella V, Bányai K,
4
5 580 Garaicoechea L, Palombo EA, Novo L, Zeller M, Arista S, Gerna G, Rahman M,
6
7 581 Ranst MV. 2009. Are Human P[14] Rotavirus Strains the Result of Interspecies
8
9 582 Transmissions from sheep or other Ungulates Belonging to the Mammalian Order
10
11 583 of Artiodactyla. *J Virol* 3204-3219.
12
13 584
14
15 585 Matthijnssens J, Rahman M, Martella V, Xuelei Y, De Vos S, De Leener K, Ciarlet
16
17 586 M, Buonavoglia C, Ranst MV. 2006. Full genomic analysis of human rotavirus strain
18
19 587 B4106 and lapine rotavirus strain 30/96 provides evidence for interspecies
20
21 588 transmission. *J Virol* 80:3801-3810.
22
23 589
24
25 590 Mijatovic-Rustempasic S, Bányai K, Esona MD, Foytich K, Bowen MD, Gentsch JR.
26
27 591 2011. Genome sequence based molecular epidemiology of unusual US Rotavirus
28
29 592 A G9 strains isolated from Omaha, USA between 1997 and 2000. *Infect Genet Evol*
30
31 593 11:522-527.
32
33 594
34
35 595 Mochizuki M, Nakagomi O, Shibata S. 1992. Hemagglutinin activity of two distinct
36
37 596 genogroups of cat and cat rotavirus strains. *Arch Virol* 122:373-381.
38
39 597
40
41 598 Mochizuki M, Nakagomi T, Nakagomi O. 1997. Isolation from diarrheal and
42
43 599 asymptomatic kittens of three rotavirus strains that belong to the AU-1 genogroup
44
45 600 of human rotaviruses. *J Clin Microbiol* 35:1272-1275.
46
47 601
48
49 602 Nakagomi O, Isegawa Y, Hoshino Y, Aboudy Y, Shif I, Silberstein I, Nakagomi T,
50
51 603 Ueda S, Sears J, Flores J. 1993. A new serotype of the outer capsid protein VP4
52
53 604 shared by an unusual human rotavirus strain Ro1845 and canine rotaviruses. *J*
54
55 605 *Gen Virol* 74:2771-2774.
56
57 606
58
59
60

- 1
2
3 607 Nakagomi O, Kaga E. 1995. Distinctness of NSP1 gene of human rotavirus AU-1
4
5 608 from NSP1 gene of other human genogroups. *Res Virol* 146:423-428.
6
7 609
8
9 610 Nakagomi O, Nakagomi T. 2002. Genomic relationships among rotaviruses
10
11 611 recovered from various animal species as revealed by RNA-RNA hybridization
12
13 612 assays. *Res Vet Sci* 73:207-214.
14
15 613 Page NA, Steele AD. 2004. Antigenic and genetic characterization of serotype G2
16
17 614 human rotavirus strains from the African continent. *J Clin Microbiol* 42:595- 600.
18
19 615
20
21 616 Palombo EA. 2002. Genetic analysis group A rotaviruses: evidence for interspecies
22
23 617 transmission of rotavirus genes. *Virus Genes* 24:11-20.
24
25 618
26
27 619 Park SIK, Matthijnssens J, Saifc LJ, Kim HJ, Park JG, Alfajaro MM, Kim DS, Son
28
29 620 KY, Yang DK, Hyun BH, Kang ML, Cho KO. 2011. Reassortment among bovine,
30
31 621 porcine and human rotavirus strains results in G8P[7] and G6P[7] strains isolated
32
33 622 from cattle in South Korea. *Vet Microbiol* 152:55-66.
34
35 623
36
37 624 Parra GI, Vidales G, Gomez JA, Fernandez FM, Parreño V, Bok K. 2008.
38
39 625 Phylogenetic analysis of porcine rotavirus in Argentina: increasing diversity of G4
40
41 626 strains and evidence of interspecies transmission. *Vet Microbiol* 126:243-250.
42
43 627
44
45 628 Rahman MJ, Matthijnssens X, Yang T, Delbeke I, Arijs K, Taniguchi M, Iturriza-
46
47 629 Gomara N, Iftekharuddin T, Azim T, Van Ranst M. 2007. Evolutionary history and
48
49 630 global spread of the emerging G12 human rotaviruses. *J Virol* 81:2382-2390.
50
51 631
52
53 632 Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for
54
55 633 reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4:406-425.
56
57 634
58
59
60

- 1
2
3 635 Santos N, Hoshino Y. 2005. Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes
4 636 and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus
5 637 vaccine. *Rev Med Virol* 15:29–56.
6
7 638
8
9
10 639 Taniguchi K, Urasawa T, Urasawa S. 1994. Species specificity and interspecies
11 640 relatedness in VP4 genotypes demonstrated by VP4 sequence analysis of equine,
12 641 feline, and canine rotavirus strains. *Virology* 200:390–400.
13
14 642
15
16 643 Tate JE, Burton AH, Boschi-Pinto C, Steele AD, Duque J, Parashar UD. 2011. 2008
17 644 estimate of worldwide rotavirus-associated mortality in children younger than 5
18 645 years before the introduction of universal rotavirus vaccination programmes: a
19 646 systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 3099:70253-70255.
20
21 647
22
23 648 Tsugawa T, Hoshino Y. 2008. Whole genome sequence and phylogenetic analyses
24 649 reveal human rotavirus G3P[3] strains Ro1845 and HCR3A are examples of direct
25 650 virion transmission of canine/feline rotaviruses to humans. *Virology* 380:344–353.
26
27 651
28
29 652 Ursu K, Kisfali P, Rigó D, Ivanics E, Erdelyi K, Dan A, Melegh B, Martella V, Bányai
30 653 K. 2009. Molecular analysis of the VP7 gene of pheasant rotaviruses identifies a
31 654 new genotype, designated G23. *Arch Virol* 154:1365-1369.
32
33 655
34
35 656 Varghese V, Das S, Singh NB, Kojima K, Bhattacharya SK, Krishnan T, Kobayashi
36 657 N, Naik TN. 2004. Molecular characterization of a human rotavirus reveals porcine
37 658 characteristics in most of the genes including VP6 and NSP4. *Arch Virol* 149:155–
38 659 172.
39
40 660
41
42 661 Varghese V, Ghosh S, Das S, Bhattacharya SK, Krishnan T, Karmakar P,
43 662 Kobayashi N, Naik TN. 2006. Characterization of VP1, VP2 and VP3 gene
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 663 segments of a human rotavirus closely related to porcine strains. *Virus Genes*
4
5 664 32:241-247.
6
7 665
8
9 666 Wang YH, Kobayashi N, Zhou X, Nagashima S, Zhu ZR, Peng JS, Liu MQ, Hu Q,
10
11 667 Zhou DJ, Watanabe S, Ishino M. 2009. Phylogenetic analysis of rotaviruses with
12
13 668 predominant G3 and emerging G9 genotypes from adults and children in Wuhan,
14
15 669 China. *J Med Virol* 81:382–389.
16
17 670
18
19 671 Wang YH, Kobayashi N, Nagashima S, Zhou X, Ghosh S, Peng JS, Hu Q, Zhou
20
21 672 DJ, Yan ZQ. 2010. Full genomic analysis of a porcine–bovine reassortant G4P[6]
22
23 673 rotavirus strain R479 isolated from an infant in China. *J Med Virol* 82:1094–1102.
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Table 1 – Characteristics of the studies on rotaviruses conducted in Belém, State of Pará, Brazil, between 1992 and 2006.

Study, abbreviated title	Study place	Period	Participant age	No. of samples collected	Strains showing		Reference
					RV positive/ No. of samples collected	Non-human characteristics in previous studies	
A, Nosocomial/ community-acquired infection	Hospital	1992 - 1994	0-5 years	48/290 (16%)	NSC206 ⁺⁺ NSC209 ⁺⁺ NSC212 ⁺⁺	Electropherotype characteristic of avian RV	Gusmão et al. (1994)
B, Neonate Project	Hospital	1996 - 1998	< 28 days	51/614 (8%)	NB150 ⁺⁺	VP4 and NSP4 of porcine origin	Mascarenhas, et al. (2007a)
C, Sentinel Hospital Project	Hospital	1998 - 2000	0-3 years	281/834 (34%)	HST327 ⁺ HSP180 ⁺ HSP034 ⁺	VP4 and NSP4 of porcine origin	Mascarenhas, et al. (2007b)
D, Surveillance Network Project	Community	2006 until today	0-5 years	66/370 (18%)	RV10109 ⁺	VP7 of feline origin	(Unpublished data)

RV: rotavirus. ⁺ Community-acquired diarrhea; ⁺⁺ nosocomial diarrhea.

Table II – Genotype constellation detected in the rotavirus strains studied based on the human prototype strain DS-1.

	VP7	VP4	VP6	VP1	VP2	VP3	NSP1	NSP2	NSP3	NSP4	NSP5	Genotype
DS-1	G2	P[4]	I2	R2	C2	M2	A2	N2	T2	E2	H2	G2-P[4]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2
NSC206	G2	x	x	R2	x	M2	A2	N2	T2	x	H2	G2-R2-M2-A2-N2-T2-H2
NSC209	G2	P[4]	x	R2	C2	M2	A2	N2	T2	x	H2	G2-P[4]-R2-C2-M2-A2-N2-T2-H2
NSC212	G2	P[4]	x	x	x	x	x	N2	T2	x	H2	G2-P[4]-N2-T2-H2
NB150	G1 + G4	P[6]	I1	R1	C1	M1	A1	x	T1	E1	H1	G1/G4-P[6]-I1-R1-C1-M1-A1-T1-E1-H1
HSP034	G2	P[6]	x	R2	C2	M2	A2	x	T2	E1	H2	G2-P[6]-R2-C2-M2-A2-T2-E1-H2
HSP180	G4	P[6]	I1	R1	C1	M1	A8	N1	T7	E1	H1	G4-P[6]-I1-R1-C1-M1-A8-N1-T7-E1-H1
HST327	G4	P[6]	x	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1	G4-P[6]-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1
RV10109	G3	P[9]	x	R2	C2	M2	A3	N1	T3	E3	H3	G3-P[9]-R2-C2-M2-A3-N1-T3-E3-H3

The genetic profile of the strains is indicated by the following colors:

Human
 Porcine
 Feline
 Bovine
 Undetermined origin
 Sequence not obtained because of the lack of stool samples

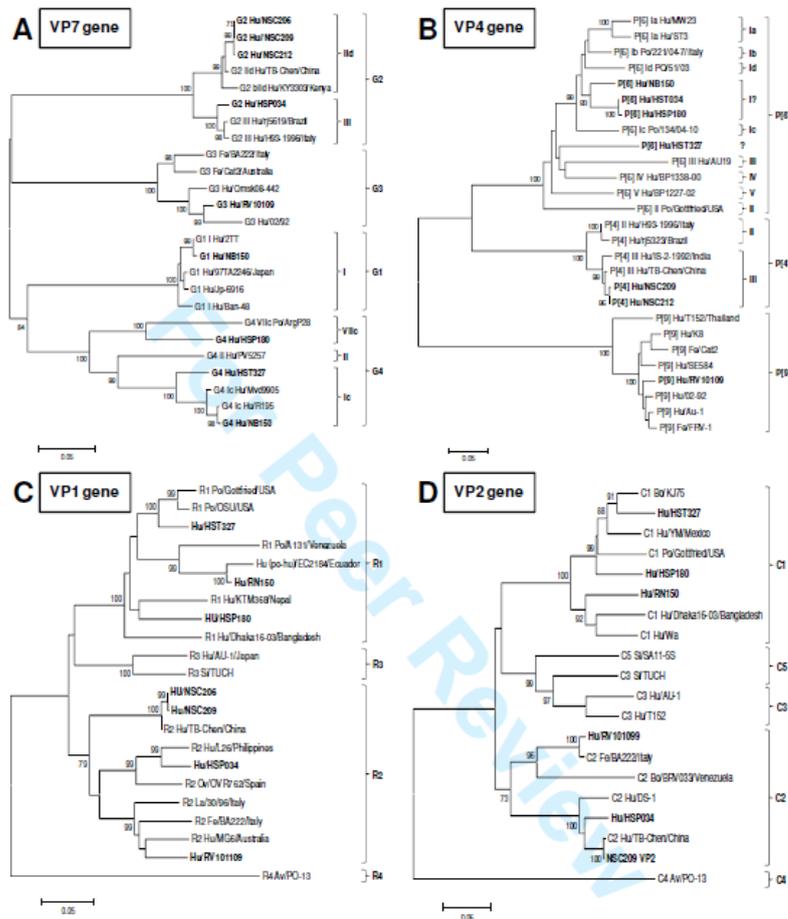
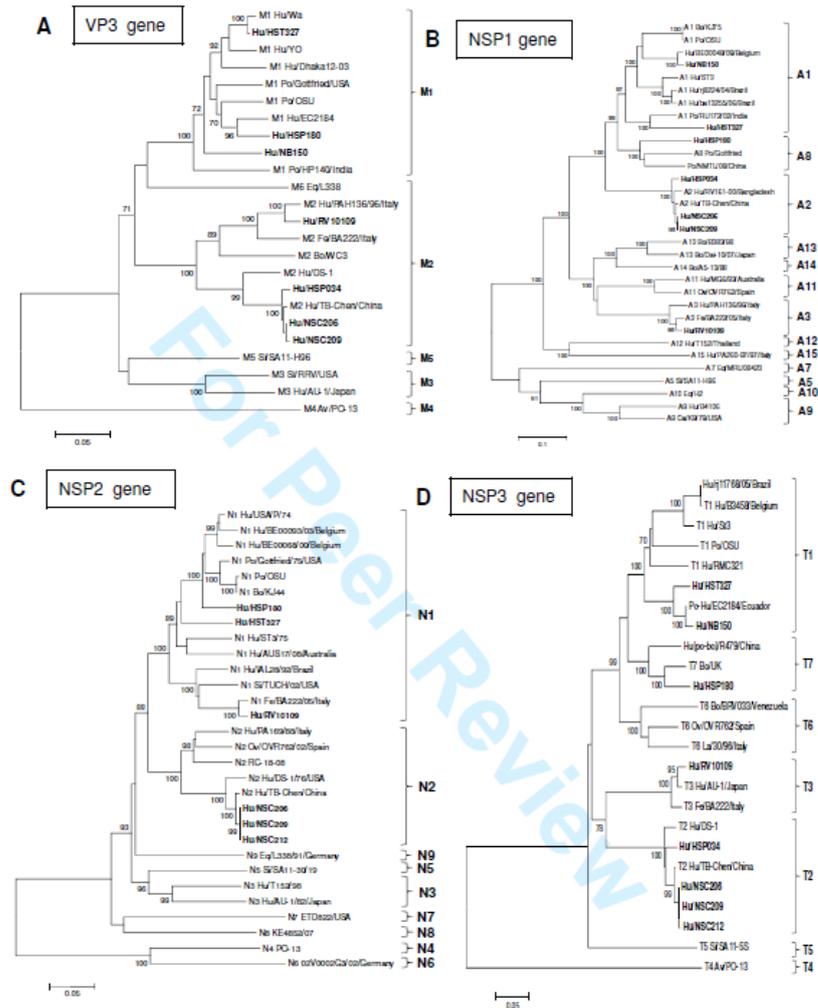


Figure 1 – Dendrogram of structural rotavirus genes representing the classification of the strains studied into different genes: **A)** VP7; **B)** VP4; **C)** VP1; **D)** VP2. The neighbor-joining method² and Kimura two-parameter model were used for phylogenetic reconstruction. Only bootstrap values (2,000 replicates) higher than 70% are indicated in the nodes of the tree.

12



13

14

15

16

17

18

19

20

Figure 2 – Dendrogram of structural and nonstructural rotavirus genes representing the classification of the strains studied into different genes: **A)** VP3; **B)** NSP1; **C)** NSP2; **D)** NSP3. The neighbor-joining method² and Kimura two-parameter model were used for phylogenetic reconstruction. Only bootstrap values (2,000 replicates) higher than 70% are indicated in the nodes of the tree.

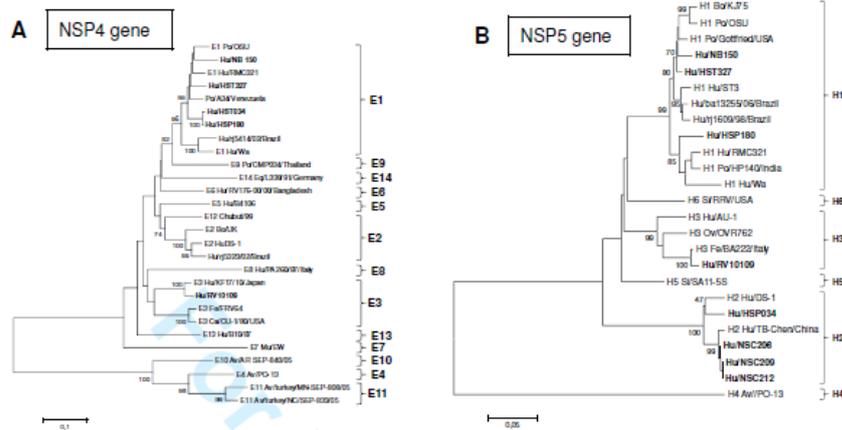


Figure 3 – Dendrogram of nonstructural rotavirus genes representing the classification of the strains studied into different genes: **A)** NSP4; **B)** NSP5. The neighbor-joining method² and Kimura two-parameter model were used for phylogenetic reconstruction. Only bootstrap values (2,000 replicates) higher than 70% are indicated in the nodes of the tree.

Apêndice II - Preparo de soluções

a) Tampão Tris-Ca⁺⁺ 0.01M, pH 7,2

Tris Base	1,21 g
Cloreto de cálcio	0,22 g
Água destilada q.s.p	1000 mL

Adicionar cloreto de cálcio e tris base em 200 mL de água destilada. Homogeneizar e completar com água até o volume final. Armazenar em recipientes transparentes e estocar a temperatura ambiente (TA).

b) Sílica

Dióxido de sílica	60 g
Água destilada q.s.p	500 mL

Homogeneizar a sílica e deixar sedimentar por 24 h. Aspirar por sucção 430 mL e desprezar o sobrenadante. Completar o volume para 500 mL com água destilada, homogeneizar, sedimentando-se naturalmente por 5h. Aspirar, por sucção, 440 mL do sobrenadante e desprezá-lo. Ajustar o sedimento para pH 2,0 pela adição de 600 µL de ácido clorídrico 37%. Aliquotar 10 mL da solução em frascos de cor âmbar, autoclavar e estocar a TA.

c) Tampão L2

Isotiocianato de guanidina	120 g
Tris-HCl 0,1 M, pH 6,4)	100 mL

Homogeneizar o isotiocianato de guanidina juntamente com tris-HCl 0,1M, pH 6,4, até dissolver totalmente o soluto. Armazenar em frascos de cor âmbar e estocar a TA.

d) Tampão L6

Isotiocianato de guanidina	120 g
Tris-HCl 0,1 M, pH 6,4	100 mL
Triton X-100	1,3 g
EDTA 0,2 M, pH 8,0	22 mL

Em um recipiente de vidro colocar EDTA 0,2 M, pH 8,0, juntamente com Tris-HCl 0,1 M, pH 6,4. Adicionar o isotiocianato de guanidina e homogeneizar o até total dissolução. Por último, acrescentar triton X-100 lentamente. Armazenar em frascos de cor âmbar e estocar a TA

e) Tris Base 2M

Tris-base	24,2 g
Água milli-Q q.s.p	100 mL

Adicionar a 50 mL de água destilada 24,2 g de tris-base e homogeneizar. Completar com água até o volume final. Ajustar para pH 8,8 com HCl 1M e filtrar. Armazenar em recipientes transparentes e estocar a 4°C.

f) Gel de agarose 1,5%

Agarose	1,5 g
Tampão TBE 1X q.s.p	100 mL

g) Tampão TBE 10X

Tris-base	108 g
Ácido bórico	55 g
EDTA 0,5 M, pH 8,0	40 mL

Diluir para uso essa solução 1X antes do uso.

Anexo

Anexo A: Documento de aprovação do Comitê de Ética em pesquisa com seres humanos do Instituto Evandro Chagas



Parecer de Aprovação nº 004/2011
Protocolo CEP/IEC - Nº 026/10
CAAE: 0027.0.072.000-10

Ananindeua/PA, 01 de fevereiro de 2011.

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM HUMANOS- CEP

Projeto: “Genes estruturais e não estruturais de rotavírus A circulantes na Amazônia: genealogia transmissão entre espécies e impacto no programa nacional de imunização anti-rotavírus”

Pesquisador Responsável: JOANA D'ARC PEREIRA MASCARENHAS

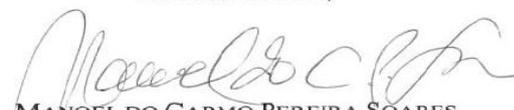
Conforme decisão do Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, cientificamos que o projeto em epigrafe foi considerado **aprovado**.

Recomendamos a coordenação que mantenha atualizados todos os documentos pertinentes ao projeto.

Este CEP se incumbirá dos procedimentos de acompanhamento preconizados pela Resolução 196/96 e suas complementares, do Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde.

Deverá ser encaminhado relatório anual e, ao final, elaborado um relatório consolidado, incluindo os resultados finais da pesquisa, em um prazo máximo de 60 (sessenta) dias, após a finalização da pesquisa.

Atenciosamente,



MANOEL DO CARMO PEREIRA SOARES
Coordenador do CEP/IEC