

**MIGUEL ANGEL ROJAS MONTES**

**Diversidade genética e potencial zoonótico de  
rotavírus da espécie A na região Sul do planalto  
Andino, Peru**



**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Norma Suely de O. Santos**



**Universidade Federal do Rio de Janeiro  
Instituto de Microbiologia Paulo de Góes  
Rio de Janeiro  
Fevereiro de 2017**

**Miguel Angel Rojas Montes**



**Diversidade genética e potencial zoonótico de  
rotavírus da espécie A na região Sul do planalto  
Andino, Peru**

**Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Paulo de  
Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos  
requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências  
Biológicas (Microbiologia).**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Norma Suely de Oliveira  
Santos**

**Rio de Janeiro  
Fevereiro de 2017**

## Ficha Catalográfica

**Rojas Montes, Miguel Angel**

Diversidade genética e potencial zoonótico de rotavírus da espécie A na região Sul do planalto Andino, Peru / Miguel Angel Rojas Montes – Rio de Janeiro: UFRJ/IMPG, 2017.

119 f.

Orientadora: Norma Suely de Oliveira Santos

Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal do Rio de Janeiro / Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Programa de Pós-graduação em Microbiologia, 2017.

1. Rotavírus 2. Zoonose 3. Diarreia Viral 4. Gastroenterite 5. Genotipagem 6. Epidemiologia I. Santos, Norma Suely de Oliveira. II – Diversidade genética e potencial zoonótico de rotavírus da espécie A na região Sul do planalto Andino, Peru.



## **FOLHA DE APROVAÇÃO**

### **Diversidade genética e potencial zoonótico de rotavírus da espécie A na região Sul do planalto Andino, Peru**

Autor: Miguel Angel Rojas Montes

Orientadora: Norma Suely de Oliveira Santos

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Microbiologia) do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Microbiologia).

Aprovado em:

Membros da Banca Examinadora:

---

Prof<sup>a</sup>. Norma Suely de Oliveira Santos, Doutora, UFRJ, Presidente da banca

---

Prof. José Mauro Peralta, Doutor, UFRJ, Membro da banca

---

Prof. Carlos Eurico Pires Ferreira Travassos, Doutor, UENF, Membro da banca

---

Dr. José Paulo Gagliardi Leite, IOC/FIOCRUZ, Membro da banca

---

Prof<sup>a</sup>. Luciana Jesus da Costa, Doutora, UFRJ, Revisora

Rio de Janeiro  
Fevereiro de 2017

## AGRADECIMENTOS

À Prof<sup>ª</sup>. Norma Suely de Oliveira Santos, pela oportunidade e confiança brindada ao longo destes 6 anos, fica na minha mente o ideal de me converter em um profissional acadêmico o mais perto possível da senhora, não tenho palavras para agradecer a oportunidade que a senhora deu para mim ao ser aceito no mestrado em seu laboratório e me convidar depois ao doutorado.

A minha amada mãe, irmão e sobrinho, Lina, Mirko e Gael, pelas palavras de incentivo, pela torcida pelo meu sucesso e por todo o amor que mesmo de longe consigo sentir de vocês, meu mundo são vocês.

A meus amigos e mentores Alberto Manchego Sayan e Cesar Lazaro de La Torre, pela amizade brindada e grande ajuda na conclusão deste trabalho e pela disposição em atender meus pedidos sempre que solicitado.

Aos amigos de laboratório que ainda estão presentes e também aos que já seguiram por outros caminhos - Luz Alba, Helver Dias e Jorge Luis Gonçalves- pela ajuda fundamental para fechar este trabalho e amizade brindada nestes 6 anos, graças a vocês não me senti sozinho estes anos no LAVIREO.

À Soluza dos Santos Gonçalves pelo apoio técnico durante a realização do trabalho e pelo grande carinho dispensado a minha pessoa. Você é a melhor Soluza.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Ensino Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), pelo apoio financeiro.

Ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes e ao Departamento de Virologia, representados pela Professora Beatriz Meurer Moreira, Coordenadora de Pós-Graduação, Professora Alane Beatriz Vermelho, Diretor do IMPG e Professor Maulori Currié Cabral, Chefe do Departamento de Virologia.

## RESUMO

### **Diversidade genética e potencial zoonótico de rotavírus da espécie A na região Sul do planalto Andino, Peru**

Rojas Montes, Miguel Angel. Diversidade genética e potencial zoonótico de rotavírus da espécie A na região Sul do planalto Andino, Peru. Tese (Doutorado em Ciências – Microbiologia), Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

Estirpes de rotavírus pertencentes a espécies A (RVA) infectam humanos e diversas espécies animais. Os RVA apresentam uma grande diversidade genética e potencial zoonótico. Neste estudo, analisamos amostras fecais de humanos e animal que coabitam no mesmo ambiente no departamento de Cusco, no Peru, a fim de avaliar a frequência, diversidade genética e epidemiologia molecular de estirpes RVA. Entre 2010 e 2014, 265 amostras fecais foram obtidas de alpacas (192), lhamas (40), ovinos (9) e crianças (24) e testadas por RT-PCR. RVA foi detectado em 20,3% de alpacas, 47,5% de lhamas, 100% das ovelhas e em 33,3% das amostras de crianças. A constelação genética mais comum em alpacas foi G3-P[40]-I8-E3-H6, em lhamas foi G1/G3-P[8]-I1-E1-H1, em ovinos foi G1/G3/2G 0-P[1]/P[8]-I1-E1-H1 e nos seres humanos foi G3-P[40]-I1/I8-E3-H1. Um novo genótipo P[40] foi identificado de uma alpaca peruana com diarreia e a sequência de genoma completo da estirpe (designado RVA/Alpaca-tc/PER/SA44/2014/G3P[40]) foi determinada. Análises filogenéticas mostraram que a estirpe possuía a constelação genética G3-P[40]-I8-R3-C3-M3-A9-N3-T3-E3-H6, que diferem consideravelmente daqueles de estirpes isoladas de outras espécies da ordem *Artiodactyla*. O genótipo recém descrito, P[40], foi identificado entre todas as espécies estudadas, incluindo humanos. Um genótipo possivelmente novo P também foi identificado em alpaca. A análise comparativa das sequências nucleotídica de estirpes apresentando a mesma constelação genética, mostrou 100% de identidade entre elas. Estes dados demonstram a grande diversidade genética de RVA obtidos de alpaca, lhama, ovelhas e seres humanos de Cusco. A análise filogenética das estirpes sugere que estas possivelmente representam transmissão zoonótica entre as espécies estudadas.

1. Rotavírus 2. Zoonose 3. Diarreia Viral 4. Gastroenterite 5. Genotipagem 6. Epidemiologia

Rio de Janeiro  
Fevereiro de 2017

## ABSTRACT

### **Diversidade genética e potencial zoonótico de rotavírus da espécie A na região Sul do planalto Andino, Peru**

Rojas Montes, Miguel Angel. Diversidade genética e potencial zoonótico de rotavírus da espécie A na região Sul do planalto Andino, Peru. Tese (Doutorado em Ciências – Microbiologia), Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

Rotavirus strains belonging to species A (RVA) infect humans and a number of animal species. RVA shows vast genetic diversity and zoonotic potential. In this study, we analyzed fecal specimens obtained from humans and animal that cohabits in the same environment in in the department of Cusco in the Peru in order to evaluate the frequency, genetic diversity, and molecular epidemiology of RVA strains. Between 2010 and 2014, 265 fecal specimens were obtained from alpacas (192), llamas (40), sheep (9) and shepherd children (24), and tested by RT-PCR. RVA was detected in 20,3% of alpacas, 47.5% of llamas, 100% of sheep and in 33.3% of children samples. The most common genetic constellation in alpacas was G3-P[40]-I8-E3-H6, in llamas was G1/G3-P[8]-I1-E1-H1, in sheep was G1/G3/2G0-P[1]/P[8]-I1-E1-H1 and in humans was G3-P[40]-I1/I8-E3-H1. A new genotype P[4] was identified from a neonatal Peruvian alpaca presenting with diarrhea, and the full-length genome sequence of the isolate (designated RVA/Alpaca-tc/PER/SA44/2014/G3P[40]) was determined. Phylogenetic analyses showed that the isolate possessed the genotype constellation G3-P[40]-I8-R3-C3-M3-A9-N3-T3-E3-H6, which differs considerably from those of RVA strains isolated from other species of the order *Artiodactyla*. The newly described genotype, P[40], was identified among all studied species, including human. A possibly new P genotype was also identified in alpaca. The comparative analysis of nucleotide sequences of strains bearing the same genetic constellation, shown 100% identity among them. These data demonstrate large genetic diversity of RVA obtained from alpaca, llama, sheep and humans from Cusco. The phylogenetic analysis of strains suggests that those strains are likely to represent zoonotic transmission among the species studied.

1. Rotavirus 2. Zoonosis 3. Viral diarrhea 4. Gastroenteritis 5. Genotyping 6. Epidemiology

Rio de Janeiro  
February de 2017



## Lista de Figuras

<b>Figura 1</b>	Codificação e localização das proteínas de rotavírus.....	4
<b>Figura 2</b>	Classificação genotípica dos rotavírus espécie A (RVA) em base na sequência dos 11 segmentos de RNA genômico.....	8
<b>Figura 3</b>	Estruturas de segmentos genômicos rearranjados de rotavírus.....	12
<b>Figura 4</b>	Diagrama esquemático mostrando a troca de segmentos genômicos entre os pools de genes de RV de origem humana e animal, que possivelmente ocorrem através de eventos de transmissão interespecies e reagrupamento.....	14
<b>Figura 5</b>	Representação esquemática do mecanismo de reagrupamento em rotavírus.....	15
<b>Figura 6</b>	Esquema da Infecção por RV nas células do epitélio do intestino delgado.....	17
<b>Figura 7</b>	Mecanismo da patogênese dos rotavírus.....	19
<b>Figura 8</b>	Esquema do fenômeno de reagrupamento dos genes que codificam as proteínas superficiais das estirpes de RVA G1P[8] e G2P[4] que cocirculam na população.....	25
<b>Figura 9</b>	Constelações genotípicas de estirpes incomuns de RVA de origem humana.....	33
<b>Figura 10</b>	Coleta das amostras fecais das espécies animais.....	42
<b>Figura 11</b>	Percentual de amostras fecais positivas para RVA, por sítio de coleta, entre as diferentes espécies estudadas.....	52
<b>Figura 12</b>	Dendrograma construído a partir das sequências parciais da VP7 de estirpes de RVA.....	55
<b>Figura 13</b>	Dendrograma construído a partir das sequências parciais da VP4 (VP8*) de estirpes de RVA.....	58
<b>Figura 14</b>	Dendrograma construído a partir das sequências parciais da VP6 de estirpes de RVA.....	60
<b>Figura 15</b>	Dendrograma construído a partir das sequências parciais da NSP4 de estirpes de RVA.....	62
<b>Figura 16</b>	Dendrograma construído a partir das sequências parciais da NSP5 de estirpes de RVA.....	64
<b>Figura 17</b>	Genotipagem das estirpes de RVA por multiplex PCR.....	66
<b>Figura 18</b>	Micrografia eletrônica da estirpe RVA/Alpaca-tc/PER/SA44/2014/G3P[40].....	70
<b>Figura 19</b>	Distribuição dos diferentes genótipos G, P, I, E e H das estirpes de RVA, por espécie estudada.....	71
<b>Figura 20</b>	Dendrogramas construídos a partir da sequência nucleotídica das OFR completas dos genes que codificam VP1-VP3, VP6, VP7 e NSP1-NSP5 da estirpe RVA/Alpaca-tc/PER/SA44/2014/G3P[40] e estirpes de referência.....	76
<b>Figura 21</b>	Dendrograma construído a partir da sequência completa da VP4 de estirpes de RVA.....	82

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1</b>	Espécies de rotavírus detectados até o momento em diferentes hospedeiros.....	6
<b>Tabela 2</b>	Valores de corte da porcentagem de identidade de nucleotídeos que definem novos genótipos para os 11 segmentos genômicos de RVA.....	9
<b>Tabela 3</b>	Descrição das amostras fecais que foram analisadas neste estudo....	41
<b>Tabela 4</b>	Distribuição geral das amostras positivas para RVA entre as diferentes espécies hospedeiras analisadas no período 2010-2014...	51
<b>Tabela 5</b>	Genótipos G, P, I, E e H identificados nas estirpes de RVA detectadas no estudo.....	67
<b>Tabela 6</b>	Porcentagem de identidade de nucleotídeos e aminoácidos dos segmentos do genoma completo da estirpe RVA/Alpacatc/PER/SA44/2014/G3P [40] comparado a sequência do gene cognato das estirpes mais próximas filogeneticamente presentes da base de dados do <i>GenBank</i> .....	73
<b>Tabela 7</b>	Constelação genômica da estirpe RVA/Alpacatc/PER/SA44/2014/G3P[40] comparada com estirpes de referência e de outros camelídeos.....	74

## Lista de Abreviaturas e Siglas

RVA	Rotavírus espécie <i>A</i>
RV	Rotavírus
VP	Proteína viral, do inglês <i>viral protein</i>
RNA	Ácido ribonucleico, do inglês <i>ribonucleic acid</i>
RNA f.d.	RNA de fita dupla
OMS	Organização Mundial da Saúde
NSP	Proteína não estrutural, do inglês, <i>non structural protein</i>
RpRd	RNA polimerase-RNA dependente
DLP	Partículas de camada dupla, do inglês <i>double layer particle</i>
TLP	Partículas de camada tripla, do inglês, <i>triple layer particles</i>
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida, do inglês <i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>
RNA <sub>m</sub>	RNA mensageiro
RVB	Rotavírus espécie <i>B</i>
RVC	Rotavírus espécie <i>C</i>
RVD	Rotavírus espécie <i>D</i>
RVE	Rotavírus espécie <i>E</i>
RVF	Rotavírus espécie <i>F</i>
RVG	Rotavírus espécie <i>G</i>
RVH	Rotavírus espécie <i>H</i>
RVI	Rotavírus espécie <i>I</i>
RVJ	Rotavírus espécie <i>J</i>
RCWG	Grupo de Trabalho para Classificação de Rotavírus, do inglês <i>Rotavirus Classification Working Group</i>
NTPase	Nucleotídeo trifosfatase, do inglês <i>nucleoside triphosphatases</i>
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase associada a transcrição reversa, do inglês <i>reverse transcription polymerase chain reaction</i>
ORF	Sequência de leitura aberta, do inglês <i>open read frame</i>
NCR	Região não codificante, do inglês <i>non coding region</i>
AB	Atresia biliar
RE	Retículo endoplasmático
Vi	Viroplasma
PLC	Fosfolipase C, do inglês <i>phospholipase C</i>
TJ	Junções intercelulares de coesas, do inglês <i>tight junctions</i>
IP3	Inositol fosfato 3, do inglês <i>inositol trisphosphate</i>
IP3R	Receptor específico de inositol fosfato 3, do inglês <i>inositol trisphosphate 3 receptor</i>
5-HT	5-hidroxitriptamina (serotonina)
SNE	Sistema nervoso entérico
EIA,	Ensaio imunoenzimáticos, do inglês <i>enzyme immunoassay</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
Ac	Anticorpo
NAC	Anticorpo neutralizante

CSA	Camelídeos sul americanos
OPAS	Organização Pan-americana da Saúde
FUT2	Fucosiltransferase 2
UNMSM-FMV	Universidad Nacional Mayor de San Marco - Facultad de Medicina Veterinaria
IVITA	Instituto Veterinário de Investigaciones Tropicales y de Altura
masl	Metros acima do nível do mar, do inglês <i>metres above sea level</i>
LAVIREO	Laboratório de Viroses Respiratórias, Entéricas e Oculares
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
PBS	Tampão salina fosfato, do inglês <i>phosphate-buffered saline</i>
DEPC	Dietil etilenodiamino, do inglês <i>diethylcarbonate</i>
EDTA	Ácido tetra acético etilenodiamino, do inglês <i>ethylenediamine tetraacetic acid</i>
cDNA	DNA complementar, (ácido desoxirribonucleico complementar, do inglês <i>complementary deoxyribonucleic acid</i> )
dATP:	Deoxiadenosina trifosfato
dCTP:	Deoxicitidina trifosfato
dGTP:	Deoxiguanosina trifosfato
dNTP:	Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
dTTP:	Deoxitimina trifosfato
mL:	Mililitro
mM:	Milimolar
nm:	Nanômetro
µL:	Microlitro
PCR:	Reação em cadeia da polimerase, do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>
MEM	Meio mínimo essencial de Eagle, do inglês <i>Eagle's minimum essential medium</i>
MA-104	Células de rim de macaco <i>Cercopithecus aethiops</i>
TEM	Microscopia eletrônica de transmissão, do inglês <i>transmission electron microscopy</i>
CPE	Efeito citopático, do inglês <i>cytopathic effect</i> )
pb	Pares de base
pH	Potencial hidrogeniônico
ppm	Partes por milhão
pM	Picomol
IBAMA	Instituto do Meio Ambiente Brasileiro

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução</b> .....	1
1.1. Rotavírus.....	2
1.1.1. Histórico.....	2
1.1.2. Taxonomia, estrutura e propriedades físico-químicas.....	3
1.1.3. Classificação dos rotavírus.....	5
1.1.4. Classificação dos RVA com base na sequência dos 11 segmentos de RNA genômico (genótipos) .....	6
1.1.5. Mecanismos de evolução e diversidade dos rotavírus.....	9
1.1.5.1. Acúmulo de mutações pontuais em rotavírus.....	10
1.1.5.2. Rearranjos dos segmentos genômicos de rotavírus.....	10
1.1.5.3. Reagrupamento.....	12
1.1.6. Patogênese.....	16
1.1.7. Sinais clínicos, diagnóstico e tratamento.....	20
1.1.8. Resposta imune.....	21
1.1.9. Epidemiologia molecular das estirpes de RVA.....	22
1.1.9.1. Epidemiologia e vigilância em seres humanos.....	23
1.1.9.2. Epidemiologia e vigilância em espécies animais de interesse neste estudo.....	25
1.1.9.3. Epidemiologia da rotavirose no Peru.....	27
1.1.10. Potencial zoonótico das estirpes de RVA.....	29
<b>2. Justificativa</b> .....	35
<b>3. Objetivos</b> .....	38
3.1. Objetivo Principal.....	38
3.2. Objetivos Específicos.....	38
<b>4. Materiais e Métodos</b> .....	39
4.1. Questões éticas.....	39
4.2. Tipo de estudo.....	39
4.3. População e amostras.....	39
4.4. Critérios de inclusão e exclusão.....	39
4.4.1. Critério de inclusão.....	39
4.4.2. Critérios de exclusão.....	39
4.5. Coleta de amostras.....	40
4.6. Processamento das amostras fecais.....	43
4.7. Controles positivos.....	43
4.8. Extração do RNA viral.....	43
4.9. Detecção de RVA.....	44
4.9.1. Produção do DNA complementar viral (cDNA).....	44
4.9.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR) e ( <i>semi</i> ) <i>nested</i> PCR.....	44
4.10. Genotipagem das amostras positivas para RVA.....	45
4.10.1. Genotipagem através de sequenciamento do genoma viral.....	45
4.10.1.1. Análise das Sequências.....	46
4.10.2. Genotipagem através da reação de multiplex PCR.....	47
4.11. Isolamento de RVA em cultura de células.....	47
4.12. Análise Estatística.....	48

<b>5. Resultados</b> .....	49
5.1. Detecção de infecções por RVA, em amostras fecais de camelídeos, carneiros e seres humanos nativos da serra sul do Peru.....	49
5.2. Identificação dos genótipos das estirpes de RVA detectadas.....	51
5.2.1. Identificação dos genótipos G (VP7), P (VP4), I (VP6), E (NSP4) e H (NSP5) por sequenciamento.....	51
5.2.1.1. Identificação dos genótipos G (VP7) .....	52
5.2.1.2. Identificação dos genótipos P (VP4) .....	55
5.2.1.3. Identificação dos genótipos I (VP6) .....	58
5.2.1.4. Identificação dos genótipos E (NSP4) .....	60
5.2.1.5. Identificação dos genótipos H (NSP5) .....	62
5.2.2. Identificação dos genótipos G (VP7), P (VP4), I (VP6), E (NSP4) e H (NSP5) por <i>multiplex</i> RT-PCR.....	64
5.3. Avaliação da incidência dos diferentes genótipos identificados entre as espécies estudadas.....	68
5.4. Isolamento, em cultura de células, de estirpes contendo possíveis novos genótipos e sequenciamento do genoma completo destas estirpes.....	70
5.5. Avaliação da ocorrência de infecções interespecies na população estudada.	82
<b>6. Discussão</b> .....	83
<b>7. Conclusões</b> .....	91
<b>8. Referências Bibliográficas</b> .....	92
<b>9. Material Suplementar</b> .....	106
<b>10. Anexos – Publicações associadas a tese</b> .....	119

## 1. Introdução

Os rotavírus (RV) pertencentes à espécie A (RVA) são agentes etiológicos de diarreia aguda em várias espécies hospedeiras tais como aves e mamíferos (Estes e Greenberg, 2013). Estes vírus apresentam uma grande variedade de estirpes as quais apresentam grande diversidade e isoladas de seres humanos que compartilham características genéticas e antigênicas com estirpes de origem animal (Gentsch *et al.*, 2005; Santos e Hoshino, 2005; Bányai *et al.*, 2012). Estes achados sugerem que a transmissão interespécies é um mecanismo de evolução importante e contribui para a diversidade dos RVA (Ghosh e Kobayashi, 2011, 2014; Dóro *et al.*, 2015; Phan *et al.*, 2016). Levantamentos epidemiológicos e estimativas de carga da doença (é o impacto de um problema de saúde, medida pelo custo financeiro, mortalidade, morbidade ou outros indicadores. Isso muitas vezes é quantificado em termos de anos de vida ajustados por qualidade (QALY, do inglês *quality-adjusted life years*) ou anos de vida ajustados por incapacidade (DALYs, do inglês *disability-adjusted life years*), ambos quantificam o número de anos perdidos devido à doença (YLDs, do inglês *years lost due to disease*) realizados entre crianças em todo o mundo revelaram que os RVA são responsáveis por aproximadamente meio milhão de mortes anuais, principalmente em países do sul e sudeste da Ásia, África subsaariana e América Latina (Parashar *et al.*, 2003; Parashar *et al.*, 2009; Tate *et al.*, 2012).

Em animais, os RVA são considerados a principal causa de diarreia viral em suínos, bovinos, caprinos, ovinos e equinos (Dhama *et al.*, 2009). Além disso, são comumente associados a infecções entéricas sintomáticas ou assintomáticas em lagomorfos, caninos e felinos (Estes e Grennberg, 2013). Estudos demonstram que uma ampla variedade de animais exóticos também é suscetível às infecções por RVA, como por exemplo: quirópteros (morcegos) (He *et al.*, 2013; Xia *et al.*, 2014; Asano *et al.*, 2016) bovídeos (antílopes) (Matthijnssens *et al.*, 2009b) e camelídeos (alpacas, guanacos, vicunhas e camelos) (Rivera, Madewell e Ameghino 1987; Parreño *et al.*, 2001; Papp *et al.*, 2012; Badarraco *et al.*, 2013).

A necessidade de uma maior vigilância epidemiológica das estirpes de RVA detectadas em humanos deve-se principalmente a avaliação da eficiência das duas vacinas contra RVA que são usadas nos programas de imunização para crianças recomendados pela Organização Mundial da Saúde (OMS). A RotaTeq<sup>TM</sup>, vacina pentavalente produto do reagrupamento humano-bovino de cinco estirpes atenuadas de RVA (contendo os genótipos de origem humana G1, G2, G3, G4, e P[8] e os genótipos de origem bovina G6 e P7[5]) (Heaton e Ciarlet, 2007) e a Rotarix<sup>TM</sup>, vacina

monovalente atenuada que utiliza a estirpe de RVA de origem humana G1P[8] (Ward, McNeal e Steele 2008). Ambas mostraram ser altamente eficientes em países pobres da Ásia, África e América Latina (Heaton e Ciarlet, 2007; Vesikari *et al.*, 2006; Ward, McNeal e Steele 2008). Contudo, estudos recentes mostram que estas vacinas geram uma imunidade eficiente contra estirpes homólogas (estirpes comuns em uma espécie), mas com as estirpes heterólogas (estirpes incomuns em uma espécie) a resposta imunológica protetora é baixa (Desselberger, 2014). Este pode ser um fator preocupante em países em desenvolvimento, onde comumente ocorre a circulação simultânea de um grande número de genótipos, os quais não estão presentes nas referidas vacinas (Santos e Hoshino, 2005). O problema fica mais acentuado em países que não realizam a vigilância epidemiológica das estirpes que circulam comumente em seus territórios e, sobretudo nas regiões mais pobres onde, em alguns casos, os animais domésticos e selvagens ficam em contato com os habitantes das comunidades rurais, que por sua vez não possuem serviços básicos fundamentais como água e esgoto, favorecendo a ocorrência de transmissão interespecíes (Cook *et al.*, 2004; Parashar *et al.*, 2009; Tate *et al.*, 2012; Phan *et al.*, 2016).

Desta forma, a vigilância epidemiológica contínua das estirpes de RVA de origem humana e animal é fundamental para ajudar a compreender melhor os mecanismos de evolução e diversidade genética deste vírus, os quais podem favorecer a transmissão interespecíes de algumas estirpes, aumentando seu potencial zoonótico ou, afetar a eficiência das vacinas existentes. Além disso, pouco se sabe sobre a evolução e epidemiologia das estirpes de RVA sob a pressão seletiva relacionada ao uso da vacina (Cook *et al.*, 2004; Martella *et al.*, 2010; Ghosh e Kobayashi, 2011, 2014; Desselberger *et al.*, 2014; Dóro *et al.*, 2015).

## **1.1. Rotavírus**

### **1.1.1. Histórico**

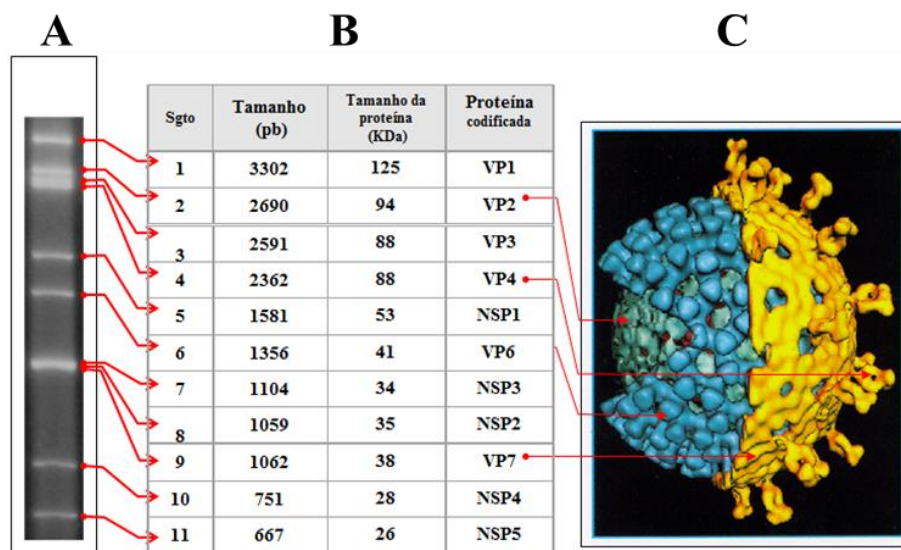
Os RV foram reconhecidos como a principal causa de diarreia aguda em infantes e crianças jovens em 1973 (Bishop *et al.*, 1973; Flewett, Bryden e Davies, 1973). Antes desse ano o vírus já havia sido descrito em murinos (Adams e Kraft, 1963), símios (Malherbe e Harwin, 1967) e bovinos (Mebus *et al.*, 1969), com quadro de diarreia grave. Desde então, os RV têm sido associados à diarreia em quase todas as espécies de mamíferos jovens incluindo quirópteros (Estes e Greenberg, 2013; He *et al.*, 2013) e aves (Trojnar, Otto e Johne, 2009; Otto *et al.*, 2012; Kindlers *et al.*, 2013).



### 1.1.2. Taxonomia, estrutura e propriedades físico-químicas

Os RV são membros da família *Reoviridae*, subfamília *Sedoreovirinae*, gênero *Rotavirus*. O genoma viral é composto por 11 segmentos de ácido ribonucleico (RNA, do inglês *ribonucleic acid*) de fita dupla (RNA f.d.) que codifica seis proteínas estruturais (VP, do inglês *viral protein*), VP1 – VP4, VP6 e VP7, e seis proteínas não estruturais, (NSP, do inglês *non structural protein*), NSP1 – NSP6 (**Figura 1**) (Estes e Greenberg, 2013). A partícula infecciosa (vírion) mede aproximadamente 75 nm de diâmetro e não apresenta envelope bilipídico. Entretanto, o genoma encontra-se envolvido por três camadas de proteínas. A camada mais interna consiste da VP2, que envolve o genoma, e duas outras proteínas estruturais: VP1 (RNA polimerase-RNA dependente – RpRd) e VP3 (responsável pelo capeamento do RNA mensageiro (RNAm), formando o core da partícula viral. A camada intermediária, é formada pela VP6, que envolve o core formando as partículas de camada dupla (DLP, do inglês *double layer particle*). A VP6 é o principal componente estrutural do vírion e tem um papel fundamental na estrutura da partícula devido às suas interações tanto com as proteínas da camada externa (VP7 e VP4) quanto da camada interna (VP2). A camada externa que envolve a DLP consiste da proteína VP7 e das espículas formadas pela proteína VP4, a adição dessa última camada completa o vírion, formando as partículas de camada tripla (TLP, do inglês, *triple layer particles*) (Estes e Greenberg, 2013) (**Figura 1**). Na microscopia eletrônica, as TLP dos RV apresentam morfologia semelhantes a rodas (do latim *rota* = roda), o que resultou na sua denominação como rotavírus (Flewett *et al.*, 1974). A proteína VP4, que forma as espículas virais, provavelmente é a proteína de ligação à célula, tendo papel na internalização do vírus. Ademais, está associada a diversas funções biológicas, tais como atividade hemaglutinante de algumas amostras de RV, restrição do crescimento em culturas de células e virulência. É sensível a proteólise, originando dois fragmentos: VP5\* e VP8\*. A espícula da proteína VP4 está inserida no capsídeo externo interagindo com duas moléculas da proteína VP7, contudo, na face interna o domínio globular da VP4 interage com a proteína VP6. As interações entre as proteínas VP4-VP7 e VP4-VP6 sugerem que essa proteína participa na manutenção da estrutura geométrica dos capsídeos interno e externo assim como afeta os domínios funcionais da partícula. A proteína VP7 é glicosilada e interage com a VP6 auxiliando na manutenção da estrutura viral. Ambas as

proteínas do capsídeo externo, segregam de forma independente, induzindo a produção de anticorpos neutralizantes (Estes e Greenberg, 2013; Santos e Soares, 2015).



**Figura 1.** Codificação e localização das proteínas de rotavírus.

A: Distribuição dos 11 segmentos de RNA de fita dupla em uma eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE, do inglês *polyacrylamide gel electrophoresis*). B: Tabela mostrando a codificação dos segmentos genômicos, o tamanho dos segmentos em pares de base (pb) e das proteínas codificadas por cada segmento em quilodalton (KDa, do inglês *kilodalton*), e a localização (setas vermelhas) das proteínas VP2 (verde), VP6 (azul), VP7 e VP4 (amarelo). C: Representação esquemática da partícula viral. Em verde é mostrada a core da partícula formado pela proteína VP2, em azul está representado o capsídeo interno formado pela proteína VP6 e amarelo o capsídeo externo formado pelas proteínas VP4 (espículas) e VP7.

Adaptado de: Kapikian, Hoshino e Chanock, 2001.

As proteínas não estruturais são sintetizadas nas células infectadas e atuam em vários aspectos do ciclo de replicação viral ou interagem com as proteínas do hospedeiro para influenciar na patogênese ou na resposta imune à infecção. A NSP1 é uma antagonista de interferon  $\alpha$  e  $\beta$  e está presente no citoplasma das células infectadas pelos RV (Barro e Patton, 2005; 2007). A NSP2, assim como a NSP5, participa no processo de formação do viroplasma e replicação viral durante infecções naturais (Silvestri, Taraporewala, e Patton, 2004; Campagna *et al.*, 2005). Já a NSP3 atua na tradução do RNAm, formando uma ligação entre este e a maquinaria da célula hospedeira (Vende *et al.*, 2000). A NSP4 apresenta envolvimento com a morfogênese viral e apresenta atividade enterotóxica (Estes e Greenberg, 2013; Santos e Soares, 2015).

Por serem vírus não envelopados, os RV são resistentes à extração com fluorocarbono e exposição ao éter, clorofórmio ou detergentes (desoxicolato de sódio) (Estes e Greenberg, 2013; Santos e Soares, 2015). A infecciosidade dos RV é relativamente estável dentro da faixa de pH de 3,0 - 9,0. As espículas de VP4 são removidas por tratamento em pH elevado. Repetidos processos de congelamento e descongelamento irão resultar em perda de infecciosidade e da atividade hemaglutinante. Partículas virais isoladas de seres humanos e de bezerros mantêm a infecciosidade por vários meses a 4<sup>o</sup>C ou a -20<sup>o</sup>C, quando são estabilizadas com cloreto de cálcio a 1,5 mM (Abad, Pinto e Bosch, 1997; Santos e Soares, 2015). Os RV são resistentes à inativação por desinfetantes químicos e diversos antissépticos (Abad, Pinto e Bosch, 1997), mas podem ser inativados por desinfetantes, como fenóis, cloro, formol, e β-propiolactona. O etanol (95%), talvez o desinfetante mais eficaz, exerce seu efeito através da remoção do capsídeo externo (Estes e Greenberg, 2013; Santos e Soares, 2015). Desinfetante *spray* contendo etanol (0,1% *O*-fenilfenol e etanol 79%), água sanitária (hipoclorito de sódio a 6% diluído para dar 800 ppm [partes por milhão] de cloro livre), e fenol-base (14,7% diluído 1:256 fenol em água da torneira) efetivamente duzem o título viral entre 95% a 99% após um tratamento de 10 minutos (Sattar *et al.*, 1994).

### 1.1.3. Classificação dos rotavírus

A classificação dos RV é complexa e envolve características fenotípicas, sorológicas e genotípicas, associados à análise de múltiplos genes. Com base nas propriedades antigênicas da proteína VP6, os rotavírus são divididos em oito espécies denominadas de A – H (Matthijnssens *et al.*, 2012a). Os RV das espécies A, B, C e H (RVA, RVB, RVC e RVH) infectam tanto seres humanos quanto animais, enquanto que os RV das espécies D, E, F e G (RVD, RVE, RVF e RVG, respectivamente) até o momento, somente foram detectados em animais, particularmente em aves (Matthijnssens, Martella e van Ranst, 2010) (**Tabela 1**). Recentemente, dois candidatos a novas espécies foram descritos em caninos (espécie I, RVI) (Mihalov-Kovács *et al.*, 2015) e em morcegos (espécie J, RVJ) (Bányai *et al.*, 2016).

Os RVA são epidemiologicamente mais importantes e têm sido classificados utilizando-se vários critérios. Mais especificamente, os RVA têm sido classificados com base: (i) nas propriedades antigênicas de VP6, VP7 e VP4 (subgrupos, tipos G e tipos P, respectivamente);

(ii) no padrão de migração do RNA genômico quando submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida (longo, curto, super-curto ou eletroferotipo atípico); (iii) no padrão de hibridização dos segmentos genômicos (genogrupos); e (iv) na análise da sequência nucleotídica (genótipos) (Matthijnsens *et al.*, 2008a e b; Estes e Greenberg, 2013).

**Tabela 1.** Espécies de rotavírus detectados até o momento em diferentes hospedeiros.

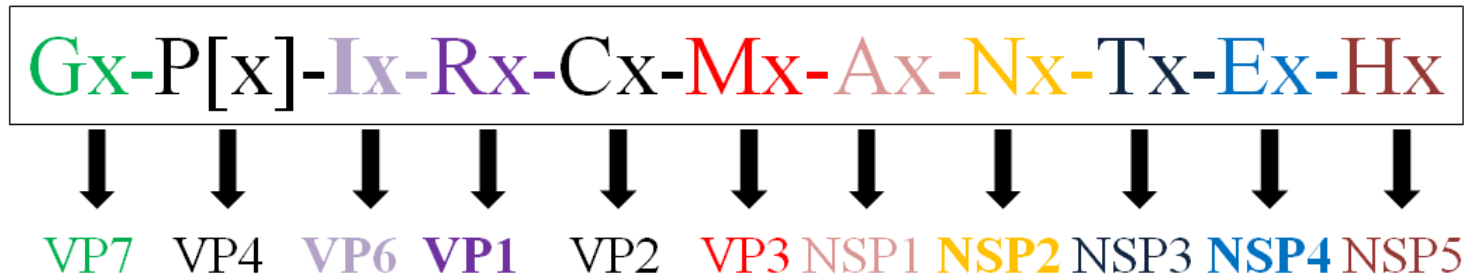
<b>Espécies de rotavírus</b>	<b>Espécies hospedeiras</b>
<b>A</b>	Ampla variedade de mamíferos e diversas espécies de aves
<b>B</b>	Humanos, bovinos, caprinos, suínos, murinos e ovinos
<b>C</b>	Humanos, bovinos, caninos, caprinos, mustelídeos (furões) e suínos
<b>D</b>	Aves (frango e peru)
<b>E</b>	Suínos
<b>F</b>	Aves (frango)
<b>G</b>	Aves (frango)
<b>H</b>	Humanos e suínos
<b>I</b>	Caninos
<b>J</b>	Quirópteros (morcegos)

Adaptado de: Ghosh e Kobayashi, 2014; Mihalov-Kovács *et al.*, 2015; Bányai *et al.*, 2016.

#### **1.1.4. Classificação dos RVA com base na sequência dos 11 segmentos de RNA genômico (genótipos)**

O Grupo de Trabalho para Classificação de Rotavírus (RCWG, do inglês *Rotavirus Classification Working Group*) é responsável pela determinação de novos genótipos, evitando assim duplicidade de informação e minimizando erros. Desta forma, quando é detectado um possível “novo” genótipo de qualquer um dos 11 segmentos de RV, a sequência deve ser enviada para o RCWG que irá proceder à análise desta sequência baseado em critérios pré-estabelecidos, e sugerir a nova nomenclatura, quando for apropriado (Matthijnsens *et al.*, 2008b). O RCWG

definiu uma nova classificação para os RVA com base na sequência de todos os 11 segmentos de RNA genômico onde as notações G<sub>x</sub>-P<sub>[x]</sub>-I<sub>x</sub>-R<sub>x</sub>-C<sub>x</sub>-M<sub>x</sub>-A<sub>x</sub>-N<sub>x</sub>-T<sub>x</sub>-E<sub>x</sub>-H<sub>x</sub> são utilizadas para os genes que codificam VP7-VP4-VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5/6, respectivamente (**Figura 2**). A letra x indica o número (algarismo arábico) do genótipo. Essa nova classificação permite uma análise mais completa dos isolados com características incomuns, que podem representar um reagrupamento entre amostras de RVA isoladas de seres humanos ou entre as amostras de humanos e de animais (Matthijnssens *et al.*, 2008b). Baseados nesta classificação são descritos atualmente 34 genótipos G, 49-P, 26-I, 21-R, 19-C, 19-M, 28-A, 20-N, 21-T, 26-E, e 21-H (Matthijnssens *et al.*, 2011a; Trojnar *et al.*, 2012; RCWG, 2016). A **Tabela 2** apresenta um resumo da nova classificação, bem como os valores de corte da percentagem de identidade das sequências de nucleotídeos para definição dos genótipos dos 11 segmentos genômicos dos RVA. Cabe ressaltar que cada genótipo tem uma estirpe de referência selecionada pelo RCWG que normalmente é o primeiro genótipo desse tipo reportado e como parâmetro deve ter a sequência completa do gene mencionado.



**Figura 2.** Classificação genotípica dos rotavírus espécie A (RVA) em base na sequência dos 11 segmentos de RNA genômico.

A anotação dos genótipos para cada gene é feita utilizando-se a uma letra correspondente a descrição do produto do gene (P. Ex. VP3 – Metiltransferase, seguido de um número. A letra x indica o número (algarismo arábico) do genótipo.

Adaptado de: Matthijssens *et al.*, 2008b, 2011a.

**Tabela 2.** Valores de corte da porcentagem de identidade de nucleotídeos que definem novos genótipos para os 11 segmentos genômicos de RVA.

<b>Gene</b>	<b>Valor de corte da % de identidade de nucleotídeos</b>	<b>Genótipo (n)<sup>b</sup></b>	<b>Descrição do produto do gene</b>
<b>VP7</b>	80 <sup>a</sup>	G (34)	<u>G</u> licosilada
<b>VP4</b>	80 <sup>a</sup>	P (49)	Sensível a <u>P</u> rotease
<b>VP6</b>	85	I (26)	Capsídeo <u>I</u> nterno
<b>VP1</b>	83	R (21)	<u>R</u> NA polimerase-RNA dependente
<b>VP2</b>	84	C (19)	Proteína do <u>C</u> ore
<b>VP3</b>	81	M (19)	<u>M</u> etiltransferase
<b>NSP1</b>	79	A (28)	<u>A</u> ntagonista de interferon
<b>NSP2</b>	85	N (20)	<u>N</u> TPase
<b>NSP3</b>	85	T (21)	Potencializador da <u>T</u> radução
<b>NSP4</b>	85	E (26)	<u>E</u> nterotoxina
<b>NSP5/6</b>	91	H (21)	Fosfoproteína (do inglês, <u>p</u> <i>Hosphoprotein</i> )

<sup>a</sup> Os valores de corte são baseados na porcentagem da identidade de aminoácidos entre os rotavírus pertencentes aos diferentes genótipos; <sup>b</sup> n - Número de genótipos.

Adaptado de: Matthijnssens *et al.*, 2008b, 2011a; Trojnar *et al.*, 2012; RCWG, 2016.

### 1.1.5. Mecanismos de evolução e diversidade dos rotavírus

A dinâmica das infecções por RV na população humana e animal, assim como sua diversidade, são reflexo dos mecanismos e forças que dirigem a evolução destes vírus. A evolução dos RV tem sido elucidada pela análise do repertório genético das estirpes circulantes utilizando principalmente o sequenciamento clássico de Sanger e, nestes últimos anos, plataformas de sequenciamento de última geração. Em consequência destas análises foram identificados diversos mecanismos que por si só ou em combinação conduzem a evolução e diversidade dos RV. Três mecanismos são considerados os mais importantes: o acúmulo de mutações pontuais no genoma (*drift*), o rearranjo de genes, e notavelmente o reagrupamento dos segmentos genômicos (Ramig, 1997; Iturriza-Gómara, Desselberger e Gray, 2003; Martella *et al.*, 2010; Ghosh e Kobayashi, 2011; Desselberger, 2014; Dóro *et al.*, 2015).

### 1.1.5.1. Acúmulo de mutações pontuais em rotavírus

As mutações pontuais dentro dos segmentos de RNAf.d. dos RV, ocorrem continuamente devido à alta taxa de erro da enzima RNA polimerase-RNA dependente do vírus, estimada em  $10^{-3}$  a  $10^{-5}$  por nucleotídeo por cópia do genoma (Domingo e Holland, 1997). Isto é traduzido em uma elevada taxa de ocorrência e de acúmulo de mutações dentro dos genes virais resultando em alterações nas sequências destes genes podendo causar variações intratípicas e emergência de linhagens genéticas dentro de genes individuais (Blackhall, Fuentes e Magnusson, 1996; Ramig, 1997). Tais variações já foram descritas nos genes que codificam a VP6 (Iturriza-Gómara *et al.*, 2002), a NSP4 (Kirkwood, Gentsch e Glass, 1999; Ciarlet *et al.*, 2000), a VP7 e a VP4 (Diwarkarla & Palombo, 1999; Gouvea *et al.*, 1999). Estas variações podem ainda afetar a função das proteínas virais (Iturriza-Gómara *et al.*, 2001, Iturriza-Gómara, Desselberger e Gray, 2003).

Este mecanismo de evolução é considerado como a principal fonte de diversidade genética para todos os vírus com genoma RNA (p.ex.: vírus da influenza, reovírus e coronavírus). Nestes últimos 20 anos foram documentadas múltiplas falhas na genotipagem e sorotipagem das estirpes de RVA devido a essas mutações pontuais acumuladas nos sítios de ligação dos iniciadores utilizados que impedem a hibridização destes na reação em cadeia da polimerase associada a transcrição reversa (RT-PCR, do inglês *reverse transcription polymerase chain reaction*) e nos sítios de reatividade de diversos anticorpos monoclonais utilizados em ensaios sorológicos (Coulson, 1996; Adah *et al.*, 1997; Palombo *et al.*, 1997; Ramig *et al.*, 1997; Iturriza-Gómara *et al.*, 2001, Iturriza-Gómara, Desselberger e Gray, 2003; Santos *et al.*, 2003). No caso dos RVA este mecanismo é considerado o segundo em importância, depois do reagrupamento dos segmentos genômicos.

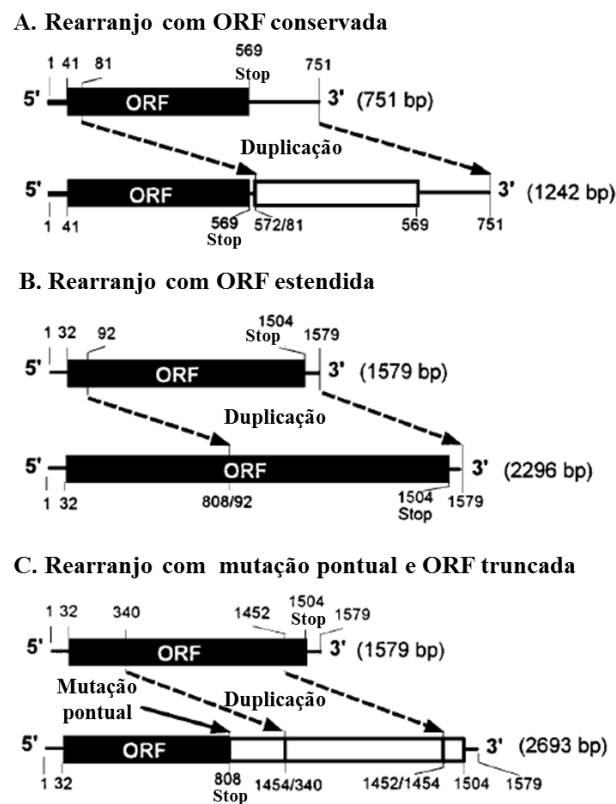
### 1.1.5.2. Rearranjos dos segmentos genômicos de rotavírus

Rearranjos ou recombinação - novos arranjos de blocos de ácidos nucleicos que envolvem trocas entre duas moléculas - tem como consequência a duplicidade parcial (concatemerização) ou deleção de sequências de nucleotídeos que ocorrem dentro um segmento de ácido nucleico, causando uma mudança radical no tamanho do segmento ou, no caso dos RNAs do RV, do gene. Rearranjos em segmentos de RNA têm sido detectados em RV isolados de humanos portadores de imunodeficiência, assim como em humanos e animais imunocompetentes. Segmentos rearranjados de RNA dos RVA têm o potencial de contribuir



para a evolução dos RV através da produção de proteínas truncadas que podem ou não perder sua função normal. Além disso, os segmentos rearranjados são capazes de fazer reagrupamento durante coinfeções, evento que será explicado posteriormente (Ramig, 1997; Iturriza-Gómara, Desselberger e Gray, 2003; Ghosh e Kobayashi, 2011; Desselberger, 2014).

O rearranjo mais comum consiste numa duplicação parcial de sequências de nucleotídeos de cabeça a cauda, que mantém a sequência de leitura aberta (ORF, do inglês *open read frame*) normal com uma extensão na região 3' não codificante (NCR, do inglês *non coding region*). Outros rearranjos possíveis podem resultar em uma ORF estendida por duplicação parcial ou truncada resultante da introdução de mutações pontuais e/ou códon de parada prematuros (**Figura 3**) (Desselberger, 1996; Ramig, 1997; Patton *et al.*, 2001). Embora a maioria dos rearranjos ocorra nos segmentos de RNA que codificam os genes não estruturais (NSP1, NSP3-5) (Ramig 1997; Patton *et al.*, 2001), também foram descritos rearranjos na proteína VP6 (Shen, Burke e Desselberger, 1994; Xu *et al.*, 1996). Acredita-se que a contribuição de rearranjos de genes para a diversidade e epidemiologia dos RVA *per se* em seres humanos e animais seja relativamente pequena, mas em combinação com os outros mecanismos é uma ferramenta poderosa na evolução deste vírus.



**Figura 3.** Estruturas de segmentos genômicos rearranjados de rotavírus.

Linhas indicam regiões não codificantes (NCR), barras sólidas mostram sequências de leitura abertas (ORF) e barras abertas mostram regiões não traduzidas derivadas de sequências da ORF que foram duplicadas. Os números de posição indicam o número do nucleotídeo dentro do gene normal. As cadeias são dos segmentos parentais e os rearranjos são indicados em pares de bases. **(A)** Rearranjo do segmento genômico 10 (NSP4) de uma estirpe de RVA de origem humana, mostrando uma ORF conservada com geração de uma extensão (concatemerização) no terminal 3'-NCR. **(B)** Rearranjos do segmento 5 (NSP1) a partir de um RVA bovino com um fragmento duplicado dentro da ORF gerando uma extensão na mesma. **(C)** Rearranjo do segmento 5 (NSP1) de RVA bovino com uma duplicação e um ponto de mutação, gerando uma ORF truncada.

Adaptado de: Ramig, 1997.

### 1.1.5.3. Reagrupamento

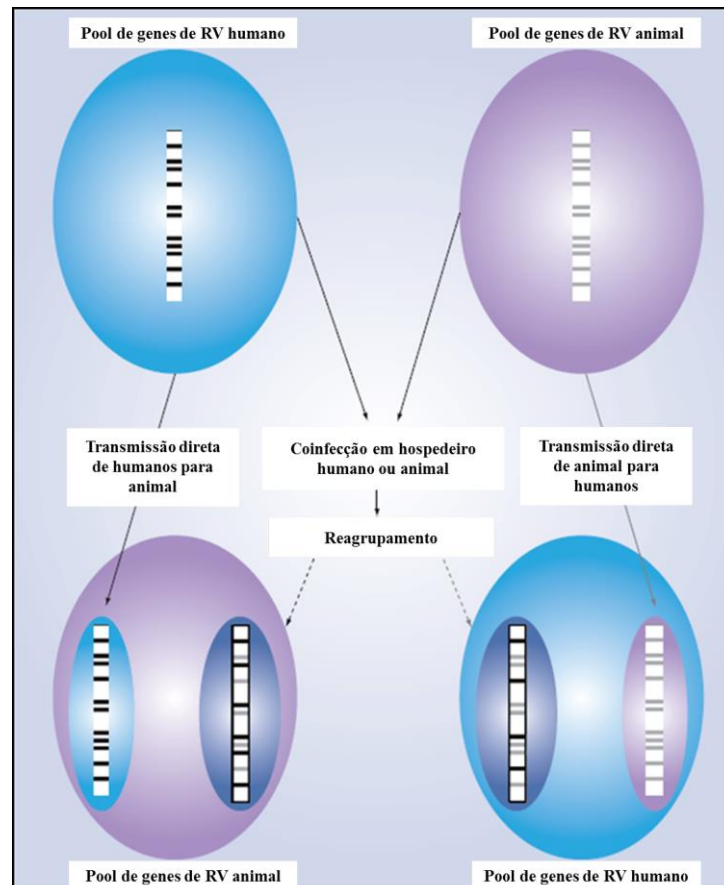
O reagrupamento consiste de uma troca/substituição de segmento(s) de RNA genômico entre diferentes estirpes de RV, que ocorre durante uma coinfeção em condições naturais (*in vivo*) ou condições experimentais (*in vitro*). Embora os vírus reagrupados possam ser gerados facilmente através da coinfeção de diferentes estirpes de RV no mesmo enterócito, este fenômeno não é inteiramente aleatório e pode ser influenciado por muitos fatores, incluindo: (i) as estirpes parentais do vírus as quais provavelmente precisam pertencer a mesma espécie

viral, uma vez que nunca foram descritos reagrupamentos entre diferentes espécies de RV, (ii) fatores do hospedeiro (coinfecção de um enterócito por diferentes estirpes) e (iii) fatores ambientais (coexistência de diferentes espécies infectadas por diferentes estirpes virais). A incidência do reagrupamento é afetada pela frequência de coinfeções e pela diversidade genética de estirpes de RV circulantes na população. Numerosos estudos epidemiológicos revelaram que algumas estirpes de RVA isoladas em humanos podem ter surgido de reagrupamentos entre estirpes de humanos e animais (**Figura 4**) (Iturriza-Gómara, Desselberger e Gray, 2003; Iturriza-Gómara, Kang e Gray, 2004; Matthijnssens *et al.*, 2010ab; Matthijnssens, Martella e van Ranst, 2010; Matthijnssens *et al.*, 2011b; Ghosh e Kobayashi, 2011, Dóro *et al.*, 2015).

O reagrupamento de vírus animais com estirpes de origem humana, pode criar vírus quiméricos portadores de segmentos de RNA de ambos os vírus parentais (Ramig, 1997; Iturriza-Gómara, Desselberger e Gray, 2003; Iturriza-Gómara, Kang e Gray, 2004). Presume-se que quando os RV cruzam a barreira interespecies, precisam adaptar-se ao novo hospedeiro para conseguir serem eficientemente disseminados na nova espécie hospedeira. Entretanto, ao adquirir os segmentos de RNA derivados de estirpes patogênicas de RVA de origem humana, esses vírus quiméricos teriam melhores chances de infectar e se disseminar de forma eficiente entre a população humana (Ramig, 1997). Em outras palavras, este mecanismo de evolução genética permite combinar as vantagens da replicação e infecção das estirpes de RV de origem humana e animal para o surgimento de estirpes que possam romper a barreira interespecies, com o potencial de causar antropozoonose (doença primária de animais e que pode ser transmitida aos humanos) e/ou zooantroponoses (doença primária de humanos e que pode ser transmitida aos animais) (Ramig, 1997; Iturriza-Gómara, Desselberger e Gray, 2003; Martella *et al.*, 2010b; Ghosh e Kobayashi, 2011; Desselberger, 2014; Dóro *et al.*, 2015).

Os reagrupamentos claramente contribuem para a diversidade dos RVA, uma vez que uma simples mistura dos segmentos genômicos pode alterar as expressões fenotípicas, genotípicas e antigênicas dos genes reagrupados (Ramig, 1997; Iturriza-Gómara *et al.*, 2001, Iturriza-Gómara, Desselberger e Gray, 2003; Desselberger, 2014; Dóro *et al.*, 2015). As análises genéticas das estirpes de RVA com combinações comuns e incomuns dos genótipos G-P descritas na população humana e de várias espécies animais proveem fortes evidências de reagrupamentos de segmentos de RNA entre estirpes de RVA cocirculantes, mas não refletem a verdadeira diversidade que existe, pelo fato de que o genoma de RVA contém 11 segmentos de RNA e os reagrupamentos podem ocorrer em qualquer segmento(s) (Iturriza-

Gómara, Desselberger e Gray, 2003; Ghosh e Kobayashi, 2011, 2014; Desselberger, 2014; Dóro *et al.*, 2015). Desta forma, estudos epidemiológicos baseados apenas na análise destes dois genes, VP7 e VP4, não são suficientes para determinar a diversidade genética e a possível origem das estirpes de RV que circulam nas populações humana e animal.



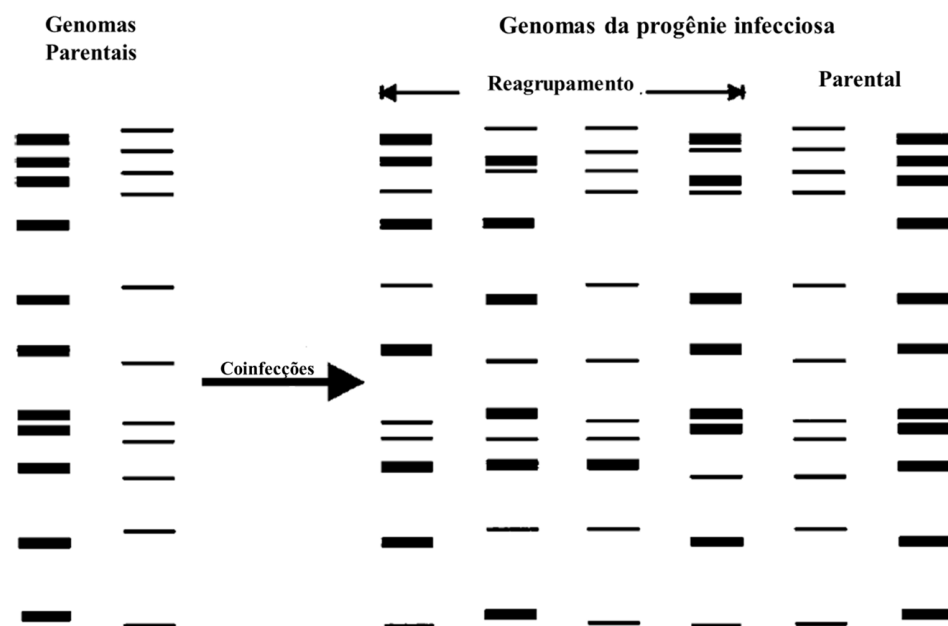
**Figura 4.** Diagrama esquemático mostrando a troca de segmentos genômicos entre os *pools* de genes de RV de origem humana e animal, que possivelmente ocorrem através de eventos de transmissão interespécies e reagrupamento.

Podemos observar que as estirpes de RVA de origem animal também podem ser diretamente transmitidas aos seres humanos.

Adaptado de: Ghosh e Kobayashi, 2011.

Foram descritas inúmeras evidências de reagrupamento dos segmentos genômicos entre estirpes de RVA (Ramig, 1997; Iturriza-Gómara, Desselberger e Gray, 2003; Martella *et al.*, 2010; Ghosh e Kobayashi, 2011; Desselberger, 2014; Dóro *et al.*, 2015). A forma de

diferenciação mais comumente utilizada entre a progênie com os segmentos de RNA reagrupados e a progênie com a constelação genômica parental é a comparação da mobilidade eletroforética dos genomas através da eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE, do inglês *polyacrylamide gel electrophoresis*). Nesta análise observa-se que a progênie viral pode apresentar constelações de segmentos genômicos que são (a) idênticos a somente um dos vírus parental ou (b) mosaicos de reagrupamentos contendo segmentos de RNA derivados das duas estirpes parentais (**Figura 5**) (Ramig, 1997).



**Figura 5.** Representação esquemática do mecanismo de reagrupamento em rotavírus.

(À esquerda): Os genomas de duas estirpes de vírus parentais tal como aparecem após a separação eletroforética. (Direita) Genomas separados por eletroforese derivados da progênie infecciosa. Note-se que a mobilidade eletroforética pode ser usada para atribuir a origem parental de cada segmento do genoma.

Adaptado de: Ramig, 1997.

Como os 11 segmentos genômicos das estirpes parentais podem, teoricamente, reagrupar em  $2^{11}$  possíveis constelações genômicas diferentes, o reagrupamento poderia ser considerado um fenômeno randômico (Ramig, 1997; Desselberger, 2014). Entretanto, este mecanismo não parece ser aleatório. *In vitro* existe uma associação não aleatória entre certos genes que são influenciados pela célula hospedeira (Graham *et al.*, 1987). *In vivo*, a célula hospedeira afeta as combinações dos segmentos reagrupados das estirpes isoladas após

coinfecções (Ramig, 1997), e experimentos em modelos animais têm mostrado que o estado imunológico do hospedeiro afeta o reagrupamento da progênie viral (Ramig, 1997; Dóro *et al.*, 2015). Enquanto *in vivo* e *in vitro*, o reagrupamento entre as estirpes de RVA ocorre com alta frequência, entre diferentes espécies de RV este fenômeno nunca foi descrito (Ramig, 1997; Iturriza-Gómara, Desselberger e Gray, 2003; Martella *et al.*, 2010; Ghosh e Kobayashi, 2011; Desselberger, 2014).

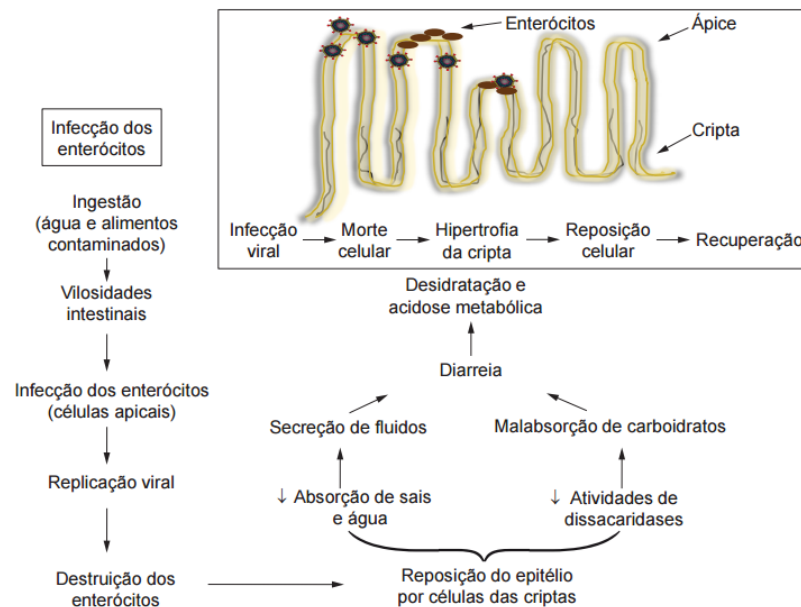
Vários dos mecanismos acima descritos atuam normalmente em combinação e, por esta razão, os RV possuem um alto grau de variabilidade genética e apresentam a possibilidade de ampliar seu espectro de hospedeiros. Além destes mecanismos, algumas estirpes de RVA animal podem ser transmitidas diretamente a humanos (Santos e Hoshino, 2005).

#### 1.1.6. Patogênese

Os RV são transmitidos por via fecal-oral, com a ingestão de água e/ou alimentos contaminados, por contato direto (entre pessoas, animais ou pessoas e animais) e superfícies contaminadas. Contudo, a alta prevalência de RV em países desenvolvidos, a despeito das condições sanitárias apropriadas, sugere a possibilidade de outras rotas de transmissão. Os RV já foram detectados na secreção de orofaringe de crianças com sintomas de infecção do sistema respiratório superior, com e sem gastroenterites, sugerindo que aerossóis provenientes de vômitos podem ser importantes fontes de transmissão (Gordon, 1982; Cook *et al.*, 2004; Estes e Greenberg, 2013; Santos e Soares, 2015).

Os RV infectam principalmente enterócitos maduros do epitélio apical das vilosidades do intestino delgado das diferentes espécies de mamíferos, onde se pode observar vacuolização e descamação do epitélio, seguido por hiperplasia das criptas e perda temporária da capacidade absorptiva do intestino, resultando no quadro de diarreia malabsortiva (**Figura 6**). Embora a disseminação extraintestinal ocorra (evidenciada pela detecção do genoma ou do antígeno viral e, ocasionalmente, de RV infeccioso em soro e outros locais do organismo) o significado destas observações em hospedeiros assintomáticos (imunocompetentes) é controverso (Fenaux *et al.*, 2006; Ramig, 2007; Ramani *et al.*, 2010). Por outro lado, em hospedeiros imunossuprimidos, os RV podem ser replicados no fígado, sistema biliar e no pâncreas, levando à associação com atresia biliar (AB) e pancreatites (Gilger *et al.*, 1992; Feng *et al.*, 2008). Uma descoberta surpreendente em modelos animais foi a descrição do início do quadro de diarreia antes do surgimento das alterações histopatológicas no intestino

delgado (Ward *et al.*, 1996), provavelmente devido à ação precoce da NSP4 (Estes e Greenberg, 2013, Desselberger *et al.*, 2014).



**Figura 6.** Esquema da Infecção por RV nas células do epitélio do intestino delgado.

O RV tem tropismo pelas células apicais das vilosidades do intestino delgado, nas quais é propagado, provocando a descamação dessas células. O vírus não é replicado nas células das criptas. Aparentemente, a infecção viral induz a destruição e a descamação dos enterócitos e, em consequência, acelera a migração de células secretórias das criptas para as vilosidades, provocando assim, uma perda temporária da capacidade absorptiva do intestino, o que leva ao quadro de diarréia.

Fonte: Santos e Soares, 2015.

A patogênese da doença por RV é multifatorial, dependendo da idade do hospedeiro, da interação vírus-hospedeiro e a virulência da estirpe, esta última é multigênica e tem sido associada aos genes virais que codificam as proteínas VP3, VP4, VP7, NSP1 e NSP4 (Estes e Greenberg, 2013; Desselberger *et al.*, 2014; Santos e Soares, 2015).

O mais proeminente fator do hospedeiro que afeta a evolução clínica da infecção é a idade. Assim, recém-nascidos infectados com RV raramente têm a doença sintomática. Essa proteção é supostamente mediada pela transferência de anticorpos maternos via transplacentária ou por amamentação. A redução dos títulos desses anticorpos coincide com a idade de máxima suscetibilidade das crianças à doença grave por RV (seis meses a dois anos

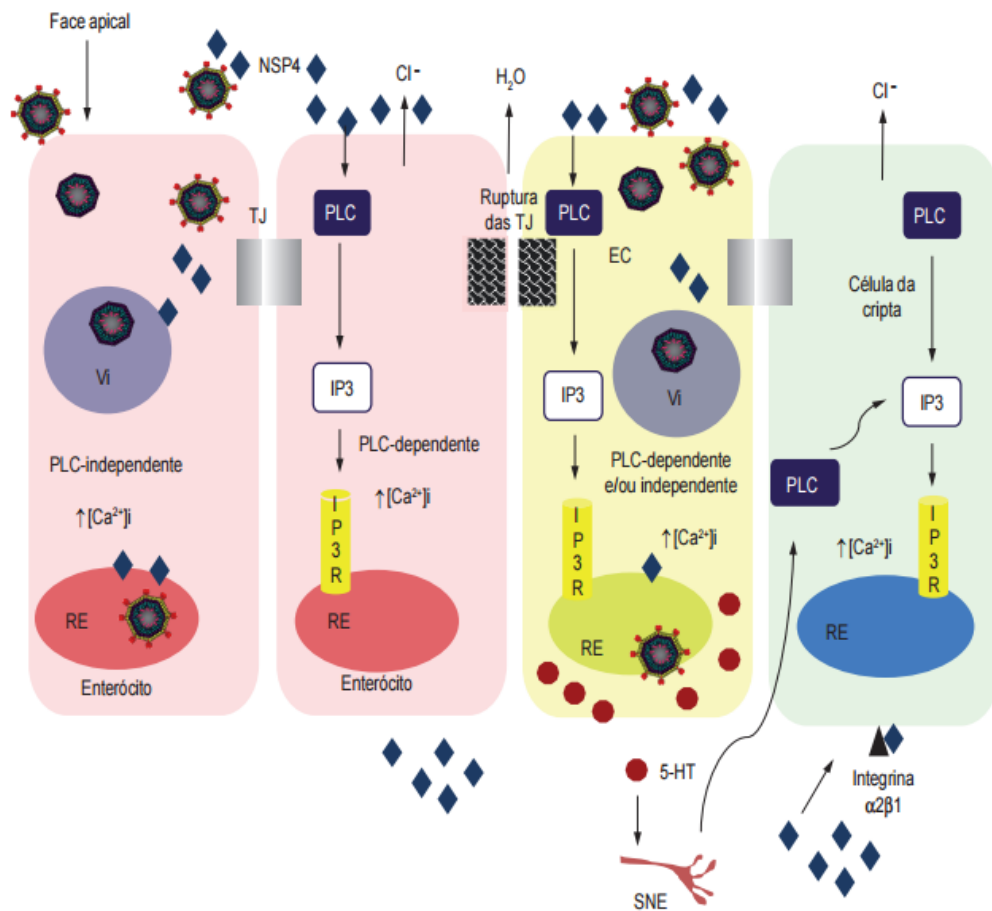
de idade), e em animais a partir da três a quatro semanas de idade. Os RV podem infectar indivíduos adultos, mas a doença sintomática grave é relativamente rara e pode resultar de infecções por uma estirpe viral incomum ou por doses infecciosas extremadamente elevadas (Estes e Greenberg, 2013; Desselberger *et al.*, 2014; Santos e Soares, 2015). Um dado importante a ser considerado é que durante um episódio de infecção por RV, as partículas virais são excretadas por vários dias, em concentrações elevadas ( $> 10^{15}$  partículas/g) nas fezes e no vômito das espécies afetadas, entretanto a dose infecciosa para ocorrer transmissão é de 1 a 100 partículas virais, demonstrando a alta infecciosidade deste agente (Ward, 1986; Alfieri, 2007; Santos e Soares, 2015).

Estirpes homólogas são, em geral, mais virulentas e apresentam maior eficiência de replicação do que as estirpes heterólogas (Iturriza-Gómara, Desselberger e Gray, 2003; Martella *et al.*, 2010). A base genética para a restrição da infecção nas espécies hospedeiras ainda não é totalmente elucidada, mas é provável que seja multigênica. Em estudos prévios, os genes que codificam as proteínas VP3, VP4, VP7, NSP1 e NSP4 foram implicados na relação infecção-estirpe-hospedeiro (Dóro *et al.*, 2015). Feng e colaboradores (2013) buscando identificar que genes estariam implicados neste processo de restrição do hospedeiro, trabalharam com as estirpes RRV (RVA símio) e EW (RVA murino) e estirpes reagrupadas destes dois vírus. Como conclusão, foi observado que os genes que codificam as proteínas VP4 e NSP1 de murino foram determinantes para a replicação eficiente destes vírus em camundongos lactentes (Feng *et al.*, 2013).

Os fatores envolvidos no mecanismo da doença são: malabsorção intestinal seguido da destruição do epitélio (enterócitos), isquemia nas vilosidades, ação da NSP4 (enterotoxina viral), e ativação do sistema nervoso entérico (Estes e Greenberg, 2013; Desselberger *et al.*, 2014; Santos e Soares, 2015) (**Figuras 6 e 7**). Recentemente, a patogênese da êmese (vômito) tem sido elucidada pela observação de que os RV podem infectar as células enterocromafins no intestino e estimular a produção de serotonina (5-hidroxitriptamina; 5-HT) e esta, por sua vez, ativaria os nervos vagais aferentes que estimulariam as estruturas do tronco cerebral que controlam a êmese ativa (Hagbom *et al.*, 2011, 2012).

A AB pode ser induzida em camundongos recém-nascidos através da infecção pelo RV, levando a uma colangiopatia obstrutiva, cuja gravidade depende da idade do hospedeiro no momento da infecção, e também pela presença e potência da resposta imune inata. Neste modelo, camundongos recém-nascidos desenvolveram proteção contra a AB através de imunização passiva, realizada pela imunização das mães com partículas RV-like ou por injeção de soro hiperimune nas crias antes da infecção (Hertel *et al.*, 2013).





**Figura 7.** Mecanismo da patogênese dos rotavírus.

A infecção inicial da célula na porção luminal do intestino (*rosa*) leva à propagação do vírus com montagem no viroplasma (Vi) e sua liberação e de proteínas virais na porção apical. A proteína NSP4 (*azul*) e partículas virais são liberadas por lise celular ou por uma via de secreção não clássica. A NSP4 intracelular também induz à liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  de estoques internos, principalmente do retículo endoplasmático (RE), por meio de um mecanismo independente da fosfolipase C (PLC, do inglês *phospholipase C*) que envolve a NSP4 atuando como uma vioporina, levando ao aumento do cálcio intracitoplasmático ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ). A NSP4 produzida pela célula infectada rompe as junções intercelulares de coesas (TJ, do inglês *tight junctions*), induzindo o fluxo paracelular de água e cloro. A NSP4, ou um peptídeo derivado desta (aa 112-175), liberando de células previamente infectadas, liga-se a um receptor específico em células não infectadas e desencadeia uma cascata de sinalizações por PLC e inositol fosfato 3 (IP3, do inglês *inositol trisphosphate*) e seu receptor específico (IP3R, do inglês *inositol trisphosphate receptor*), que resulta na liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  e um aumento da concentração de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . O aumento da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  também perturba o citoesqueleto das microvilosidades. A infecção resulta na secreção de serotonina (5-hidroxitriptamina; 5-HT) pelas células enterocromafins (EC; amarelo) estimuladas pela replicação viral (induzindo o aumento do  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  por um mecanismo PLC-independente) ou por ação da NSP4 exógena (induzindo o aumento do  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  por um mecanismo PLC-dependente), levando à ativação do sistema nervoso entérico (SNE). As células da cripta (*azul*) não sustentam a replicação viral, mas podem ser afetadas pela ação do SNE ou pela NSP4, que sinalizam uma elevação do  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  induzindo a secreção de íons  $\text{Cl}^-$ .

Fonte: Santos e Soares, 2015.

### 1.1.7. Sinais clínicos, diagnóstico e tratamento

A infecção por RV pode ser assintomática ou resultar em gastroenterite aguda com uma diarreia branda, moderada ou grave, vômitos e desidratação. A temperatura corporal é moderadamente elevada em alguns casos. O vômito precede a diarreia e dura um período mais curto (três a cinco dias). Um desequilíbrio eletrolítico maciço leva a uma desidratação frequentemente grave.

A morte por RV ocorre principalmente devido a uma grave desidratação e falha cardiovascular (Desselberger, 2014), e é rara nos países desenvolvidos e semidesenvolvidos, principalmente devido à disponibilidade de rápidas medidas de reidratação; por outro lado, a morte decorrente da rotavirose é frequente nos países da África subsaariana e do Sudeste Asiático (Tate *et al.*, 2012). Após infecção natural ou vacinação (inadvertida), as crianças com imunodeficiência podem desenvolver a infecção e uma doença crônica por RV (Desselberger, 1996; Patel *et al.*, 2013). Em crianças cronicamente infectadas, ocorre a emergência de RV com padrões de migração incomuns dos segmentos genômicos, devido à ocorrência de rearranjos gênicos (Desselberger, 1996).

Em animais, o RV produz uma diarreia leve à moderada, vômito, pelo áspero, depressão, anorexia e acidose metabólica levando a uma grande redução no ganho de peso pelos animais infectados (Fenner, Poul e Gibbs, 1993). Poucos são os casos de morte e esta depende muito da virulência da estirpe, idade do animal, problemas na transferência da imunidade passiva via colostro, programas sanitários inadequados, além da associação com outros agentes enteropatogênicos (Fenner, Poul e Gibbs, 1993; Alfieri *et al.*, 2007).

O diagnóstico da infecção por RV é comumente realizado por técnicas sorológicas como o ensaio imunoenzimático (EIA, do inglês *enzyme immunoassay*, também denominado de ELISA - *enzyme-linked immunosorbent assay*), aglutinação do látex e testes imunocromatográficos ou moleculares como a RT-PCR, para a detecção do vírus nas fezes (Santos e Soares, 2015).

Para o diagnóstico diferencial da gastroenterite causada por RV, os principais vírus a serem considerados em seres humanos são calicivírus (norovírus, sapovírus), astrovírus e em menor frequência estão os adenovírus entéricos e vírus Aichi (Santos e Soares, 2015).

O tratamento da rotavirose é sintomático e consiste principalmente na reidratação do paciente, por via oral ou intravenosa. Também podem ser utilizados antibióticos para controlar uma possível diarreia bacteriana secundária. O uso de medicamentos como

loperamida, e fármacos anticolinoesterasicos não são recomendados (American Academy of Pediatrics, 1996).

Recentemente, fragmentos de anticorpos (Ac) de cadeia simples derivados de lhama específicos para RVA-VP6, mostraram ter uma ampla reatividade cruzada, *in vitro*, levando a uma diminuição da excreção dos vírus em camundongos infectados (Garaicoechea *et al.*, 2008, Aladin *et al.*, 2012). Estes anticorpos também foram eficazes no decréscimo da replicação de RVA em leitões gnotobióticos (Vega *et al.*, 2013) e teve um efeito benéfico moderado na doença em humanos (Sarkers *et al.*, 2013; Kang, 2013; Tokuhara *et al.*, 2013). O fragmento deste Ac possui apenas 15 kDa de tamanho, permanece ativo após longo prazo (> 1 ano) de armazenamento e resiste ao aquecimento a 94°C por 90 minutos (Tokuhara *et al.*, 2013). Os Ac fragmentados de lhama foram expressos em altos níveis em arroz transgênico (MucoRice-ARP1) (Tokuhara *et al.*, 2013); em um estudo-piloto, este anticorpo suprimiu a carga de RV em camundongos tanto imunocompetentes quanto imunodeficientes e também conferiu proteção contra a infecção por RV (Tokuhara *et al.*, 2013). Assim como este Ac, outras preparações semelhantes apresentam um potencial real para uso terapêutico e profilático em seres humanos (Kang, 2013).

### 1.1.8. Resposta imune

Após a infecção por RV, a resposta imune adquirida é obtida, tanto a partir de células B produzindo anticorpos dirigidos contra proteínas específicas do vírus, como de células T que reconhecem epítomos específicos de RV (Yuan e Saif, 2002; Jiang, Gentsch e Glass, 2012; Desselberger, 2014). Muitos anticorpos dirigidos contra VP7 e VP4 na superfície da partícula de RV são neutralizantes (NAC) *in vitro* e protetores *in vivo*, como foi demonstrado por transferência passiva em camundongos e leitões gnotobióticos (Offit, 1994; Feng, Franco e Greenberg, 1997; Franco e Greenberg, 1997; Jiang, Gentsch e Glass, 2012; Yuan e Saif, 2002). A transferência passiva de células T CD8<sup>+</sup> específicas para RV também mostrou ser protetora (Offit, 1994). Os Ac específicos contra RV adquiridos por via transplacentária provavelmente protegem os recém-nascidos da infecção e interferem com a resposta imune à vacinação contra RV (Johansson *et al.*, 2008; Appaiahgari *et al.*, 2014).

A disponibilidade de vários mutantes *knockout* de camundongos tem permitido aos pesquisadores a dissecção da contribuição relativa das repostas imune humoral e celular: enquanto as células T específicas para RV ajudam a eliminar o vírus após a infecção primária, são as células B de memória contra RV geradas depois da primoinfecção que

fornecem maior proteção a longo prazo (Franco, Angel e Greenberg, 2016). Os Ac humorais potencializados após uma reinfecção são dirigidos contra epítomos tipo-específicos e apresentam reação cruzada com moléculas de VP4 e VP7, proporcionado assim, uma proteção heterotípica (Franco, Angel e Greenberg, 2006). Foi confirmado que as células dendríticas plasmocitoides são necessárias e suficientes para induzir a ativação das células B após a infecção por RV em camundongos (*in vivo*) e em células humanas (*in vitro*) (Deal *et al.*, 2013).

A proteção contra a infecção por RV não está totalmente correlacionada com a concentração de NAc específicos para VP7 e VP4. Após a infecção natural ou vacinação com RV, infantes e crianças jovens desenvolvem anticorpos contra outras proteínas estruturais (VP6 e VP2) e não estruturais (NSP4) (Desselberger, 2014). Os anticorpos específicos para VP6, apesar de não terem se mostrado neutralizantes *in vitro*, mostraram ser protetores *in vivo*, quando camundongos foram inoculados com anticorpos específicos anti-VP6 da classe de IgA (Burns *et al.*, 1996). Foi sugerido, e recentemente comprovado, que os anticorpos IgA VP6-específicos são capturados (transcitose) pelas células epiteliais intestinais através dos receptores da proteína J na membrana basolateral e formam complexos com novos DLP liberados do viroplasma, impedindo assim a sua maturação à TLP (neutralização intracelular) (Desselberg, 2014; Corthésy *et al.*, 2006; Schwartz-Cornil *et al.*, 2002; Aiyegbo *et al.*, 2013; Sapparapu *et al.*, 2014). No entanto, também foi demonstrado que camundongos e pacientes que são deficientes em IgA eliminam a infecção, provavelmente devido a uma imunidade protetora compensatória da IgG (Johansson *et al.*, 2008; Jiang, Gentsch e Glass, 2012).

A transferência passiva de anticorpos anti-NSP4 induz alguma proteção em camundongos (Hou *et al.*, 2008), porém os anticorpos anti-NSP4 adquiridos de forma ativa não foram capazes de proteger leitões gnotobióticos desafiados com RVA. Estudos prospectivos mostraram que, após uma ou duas infecções naturais por RVA, as crianças parecem estar altamente protegidas contra doenças graves por RVA heterotípicos (Hou *et al.*, 2008).

### **1.1.9. Epidemiologia molecular das estirpes de RVA**

Com o advento dos protocolos de genotipagem de RVA por RT-PCR (Gouvea *et al.*, 1990; Gentsch *et al.*, 1992; Gouvea, Santos e, Timenetsky 1994ab), estudos detalhados de epidemiologia molecular tornaram-se possíveis. A genotipagem tem um enorme valor para avaliar a evolução e as vias epidemiológicas dos RV em seres humanos, bem como em outros

mamíferos e aves (Matthijnssens *et al.*, 2011b; Matthijnssens e van Ranst, 2012). Contudo, a maioria dos estudos de epidemiologia molecular e diversidade genética de RVA ainda é focada principalmente nos genes que codificam as proteínas antigênicas de superfície VP7 e VP4. Entretanto, pelo fato de os RV possuírem um genoma composto de 11 segmentos de RNA f.d. vulnerável a eventos de reagrupamento de todos seus segmentos, a avaliação da variabilidade somente dos genes que codificam essas as proteínas, pode não ser suficiente para a obtenção de dados conclusivos sobre a diversidade global, ou ainda sobre a verdadeira origem das estirpes. Nos últimos anos, após o advento do sistema de classificação dos genótipos com base em todos os segmentos genômicos, o genoma completo de pelo menos 167 estirpes de RVA de origem humana e 45 estirpes de RVA de origem animal foram analisados, fornecendo uma infinidade de novas e importantes informações sobre a origem complexa das estirpes, eventos de reagrupamentos inter e intra genogrupos, eventos de reagrupamentos interespécies, e linhagens genéticas envolvendo diferentes segmentos dos genes dos RVA (Martella *et al.*, 2010; Ghosh e Kobayashi, 2011, 2014; Dóro *et al.*, 2015; Phan *et al.*, 2016). No que diz respeito às outras espécies de RV capazes de infectar seres humanos e animais, RVB, RVC e RVH, cabe mencionar que o número de genomas completos analisados é ainda muito pequeno, não permitindo assim uma avaliação confiável (Ghosh e Kobayashi, 2011, 2014; Phan *et al.*, 2016).

#### **1.1.9.1 Epidemiologia e vigilância em seres humanos**

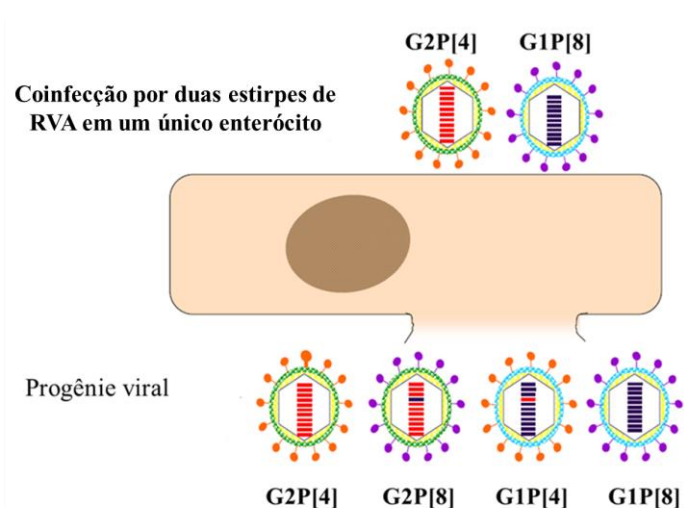
Os humanos são susceptíveis a infecções por RVA sem restrição de idade, embora as crianças de três meses a três anos sejam as que desenvolvam frequentemente a forma clínica mais grave da doença (Desselberger, 2014; Dóro *et al.*, 2015). Os RVA são geneticamente e antigenicamente diversos e dados de vigilância epidemiológica indicam que diferentes estirpes cocirculam em algumas áreas em determinados períodos de tempo (Santos e Hoshino, 2005; Patel *et al.*, 2013; Dóro *et al.*, 2015). Os países industrializados apresentam comumente um genótipo predominante numa localização geográfica em uma única estação, enquanto as estirpes minoritárias podem apresentar uma variedade diferente de genótipos (Santos e Hoshino, 2005). Nos países em desenvolvimento, nem sempre é possível identificar uma única estirpe prevalente em virtude da cocirculação de uma vasta gama de diferentes genótipos (Santos e Hoshino, 2005; Bányai *et al.*, 2012). É descrita uma alternância dos diferentes genótipos ao longo do tempo de forma que um genótipo predominante em um determinado ano pode ser menos frequente ou mesmo ausente no ano seguinte. Por outro

lado, as estirpes que não são detectadas em um ano podem se tornar importantes no ano seguinte (Santos e Hoshino, 2005; Bányai *et al.*, 2005; Martella *et al.*, 2010; Dóro *et al.*, 2015).

Estudos de vigilância epidemiológica têm identificado 14 genótipos G (G1-G6, G8-G12, G14, G20 e G26), 17 genótipos P (P[1] a P[11], P[14], P[15], P[19], P[24]; P[25] e P[28]) e perto de 90 combinações antigênicas G-P de RVA em crianças em todo o mundo (Santos e Hoshino, 2005; Bányai *et al.*, 2012). Entre estes, no entanto, apenas alguns são responsáveis pela maioria das infecções clinicamente relevantes. Globalmente, as estirpes humanas mais comuns são G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8], G9P[8] e G12P[8] (Santos e Hoshino, 2005; Bányai *et al.*, 2012). Além disso, a diversidade das estirpes é influenciada, em parte, pelo reagrupamento dos segmentos genômicos entre as principais estirpes que circulam localmente podendo levar a combinações incomuns dos genótipos G-P (Gentsch *et al.*, 1996; Gentsch *et al.*, 2005, Santos e Hoshino, 2005; Martella *et al.*, 2010; Ghosh e Kobayashi, 2011; Desselberger *et al.*, 2014; Dóro *et al.*, 2015). Por exemplo, as estirpes com os genótipos G1P[4] e G2P[8] são comumente reportados por cocirculararem com as estirpes G1P[8] e G2P[4] (Dóro *et al.*, 2014) (**Figura 8**).

Notavelmente, a predominância epidemiológica das seis combinações G-P mais comuns parece não ter mudado após a introdução das vacinas. Contudo, foi observada a predominância de estirpes G2P[4] em diversos países logo após a introdução da vacina Rotarix™ (G1P[8]) nos programas nacionais de imunização de rotina (Dóro *et al.*, 2014). Atualmente, não está claro se uma imunidade heterotípica reduzida provocada pela vacina monovalente e, portanto, um mecanismo de seleção associado à vacina, é responsável por este fenômeno, ou se a predominância da estirpe G2P[4] é explicada pelas flutuações naturais das estirpes de RVA na população (Santos e Hoshino, 2005; Matthijssens *et al.*, 2009a).

Além das seis principais estirpes de RVA, foram identificadas estirpes de importância regional em algumas áreas, como por exemplo as infecções por G5P[8] e G8P[6] em partes da América do Sul e da África subsaariana, respectivamente (Gouvea *et al.*, 1994; Alfieri *et al.*, 1996; Leite, Alfieri e Woods, 1996; Cunliffe *et al.*, 1999; Santos e Hoshino, 2005). Além disso, após a introdução da vacina, as estirpes G6P[6] e G9P[4] parecem ter causado um número significativo de infecções na África e na América Latina (Quaye *et al.*, 2013; Ndze *et al.*, 2014).



**Figura 8.** Esquema do fenômeno de reagrupamento dos genes que codificam as proteínas superficiais das estirpes de RVA G1P[8] e G2P[4] que cocirculam na população.

A figura mostra uma situação hipotética em que um único enterócito está replicando simultaneamente duas estirpes de RVA, G2P[4] e G1P[8]. Durante o processo de montagem das novas partículas pode ocorrer o reagrupamento dos segmentos genômicos destas estirpes, permitindo o surgimento de até quatro estirpes distintas: as duas estirpes parentais G2P[4] e G1P[8], além de duas estirpes reagrupadas G2P[8] e G1P[4].

Adaptado de: EuroRotaNet. Disponível em [http://www.sabin.org/sites/sabin.org/files/jim\\_gray\\_ist.pdf](http://www.sabin.org/sites/sabin.org/files/jim_gray_ist.pdf). Acesso em 13/01/2017.

Várias outras combinações antigênicas detectadas em seres humanos foram identificadas principalmente em casos esporádicos, especialmente isolados (Dóro *et al.*, 2015). Algumas destas foram descritas pela primeira vez no período pós-licenciamento dos programas de vacinação contra RVA e por isso sua origem a partir da estirpe vacinal não pode ser descartada. Os genótipos G1P[5], G2P[5] ou G6P[8] compartilham o gene da VP7 e/ou da VP4 com a estirpe parental bovina da vacina Rota-Teq<sup>TM</sup> (Dóro *et al.*, 2014). Outras estirpes raras podem ter emergido dos reservatórios animais através dos eventos de transmissão interespecíficas (Santos e Hoshino, 2005). Exemplos disto são as estirpes G3P[9] de origem felina e as estirpes de G4P[6] de origem suína detectadas em seres humanos nas últimas duas décadas em vários países em todo o mundo (Ghosh e Kobayashi, 2011; Hwang *et al.*, 2012; Quaye *et al.*, 2013; Papp *et al.*, 2013a; Dóro *et al.*, 2015).

### 1.1.9.2 Epidemiologia e vigilância em espécies animais de interesse neste estudo

As infecções sintomáticas por RVA são frequentemente descritas em mamíferos jovens e aves (Dhama *et al.*, 2009; Martella *et al.*, 2010). Em muitos aspectos, a epidemiologia molecular dos RVA em animais é semelhante à epidemiologia observada em seres humanos.

Por exemplo, em gado doméstico a epidemiologia das rotavíruses também pode se caracterizar pela substituição sequencial de estirpes ao longo do tempo em qualquer localização geográfica (Ghosh e Kobayashi, 2011, 2014). As infecções por RVA mais minuciosamente estudadas são as que afetam animais da ordem *Artiodactyla*, principalmente suínos, bovinos e equinos, e parcialmente em caprinos, ovinos e camelídeos. Revisões recentes sobre RVA em suínos, bovinos e equinos indicam que existem alguns genótipos específicos globalmente importantes para cada uma destas espécies hospedeiras (Martella *et al.*, 2010; Ghosh e Kobayashi, 2014; Papp *et al.*, 2013abc; Papp *et al.*, 2014; Papp *et al.*, 2015).

Em caprinos e ovinos até o momento, poucas estirpes de RVA têm sido caracterizadas (Dhama *et al.*, 2009). A análise de uma estirpe isolada de um ovino na China, RV/Sheep-tc/CHN/Lamb-NT/xxxx/G10P[15] revelou a presença de novos genótipos nos genes VP4 (P[15]) e VP6 (I10) com uma constelação genômica de RVA *Artiodactyla-like* ou seja, possui uma constelação genômica semelhantes a outros bovídeos como, antílopes, e bovinos (Chen *et al.*, 2009). O sequenciamento do genoma de uma estirpe incomum ovina RV/Sheep-tc/ESP/OVR762/2002/G8P[14] mostrou que esta compartilha uma constelação genotípica amplamente conservada com outras estirpes de RVA de origem *Artiodactyla*. O genoma completo de uma estirpe de RVA isolada em caprinos, RVA/Goat-tc/BGD/GO34/1999/G6P[14], revelou uma estreita relação evolutiva com estirpes de RVA de origem *Artiodactyla* (Ghosh *et al.*, 2010). Por outro lado, a análise parcial do genoma de uma estirpe incomum detectada em um caprino na Coreia, RVA/Goat-tc/KOR/GRV/1998/G3P[3], forneceu indícios de eventos de reagrupamento e/ou transmissão interespecies entre caninos/felinos e/ou símios - caprinos (Lee *et al.*, 2003).

Os RV têm sido detectados em alguns mamíferos ungulados exóticos, tais como alpaca, antílope, bisonte, javali, veado, camelo, gazela, guanacos, girafa e vicunha (Parreño *et al.*, 2001; Matthijnssens *et al.*, 2009b; Papp *et al.*, 2012; Badarracco *et al.*, 2013; Ghosh e Kobayashi, 2014; Dóro *et al.*, 2015; Garmendia *et al.*, 2015). Poucos genomas das estirpes obtidas desses animais foram estudados até o momento, portanto as informações acerca dos padrões evolutivos desses vírus são muito limitadas. O sequenciamento do genoma completo de uma estirpe de antílope e de duas estirpes de guanacos evidenciou que estas possuem uma origem comum com estirpes de RVA de ovino e de outros ruminantes, corroborando a presença de uma constelação genotípica de consenso geral (G6/G8-P[14]-I2-(R2/R5)-C2-M2-(A3/A11)-N2-T6-(E2/E12)-H3) que pode estar circulando entre ruminantes, camelídeos e outras espécies animais da ordem *Artiodactyla* (Matthijnssens *et al.*, 2009b).



Recentemente, foi sequenciado o genoma completo de uma estirpe de RVA isolada em camelo, denominada s21 (RVA/Camel-wt/KUW/s21/2010/G10P[15]), os genes VP2, NSP2, NSP3 e NSP5 desta estirpe exibiram uma relação filogenética próxima com estirpes de RVA de ovinos e bovinos, enquanto a VP1 mostrou uma identidade de nucleotídeos menor que 90% com estirpes suínas. Já os genes que codificam as proteínas VP4, VP6 e VP7 exibiram uma identidade de 88%, 82% e 83%, respectivamente, com estirpes de referência isoladas em ruminantes. O gene da NSP4 foi classificado como um genótipo distinto, denominado de E15 (Papp *et al.*, 2012).

Outro estudo recente, analisou a constelação genômica parcial de uma estirpe proveniente de uma vicunha selvagem (RVA/Vicuña-wt/ARG/C75/2010/G8P[14]), uma das quatro espécies nativas de camelídeos sul americanos (CSA) (Badaracco *et al.*, 2013), denominada de C75. Esta estirpe exibiu a constelação genotípica G8-P[14]-I2-R2-C2-M2-Ax-N2-T6-E16-Hx, onde observou-se que, com exceção dos genes NSP3 e NSP4, o genoma parcial descrito compartilha uma relação evolutiva próxima com as estirpes de RVA de origem *Artiodactyla*, especialmente com a estirpe de guanaco RVA/Guanaco-wt/ARG/Chubut/1999/G8P[14], em pelo menos cinco segmentos gênômicos (VP7, VP4, VP2, VP3 e NSP3). Já o gene da NSP4 foi classificado como um genótipo distinto, denominado de E16.

### **1.1.9.3 Epidemiologia da rotavirose no Peru**

Estudos do *Instituto Nacional de Salud del Niño* em Lima, em 1987, 1991 e 1997 detectaram RVA em amostras de fezes de 28%, 32% e 52%, respectivamente, de crianças com idades <5 anos hospitalizadas com gastroenterite grave (Greenberg *et al.*, 1991; Figueroa-Quintanilla *et al.*, 1993; Cama *et al.*, 1999).

Ehrenkranz e colaboradores (2001) estimaram o impacto da rotavirose em crianças peruanas baseado em seis estudos realizados em um período de 10 anos, cinco estudos realizados na capital, Lima (1984 - 1991), e um estudo realizado na região do Andes em Huaraz (1986-1987). Eles concluíram que aos cinco anos de idade, mais de 63% das crianças peruanas experimentavam um episódio de diarreia por rotavírus, uma em cada 10 procuraria atendimento médico, uma em cada 20 seria hospitalizada e uma em 375 morreria da doença. Por ano, isto representaria aproximadamente 384.000 casos, 64.000 visitas médicas, 30.000 hospitalizações e 1.600 mortes. O custo anual dos cuidados médicos para essas crianças seria

de aproximadamente US\$ 2,6 milhões — sem levar em conta os custos indiretos ou sociais da doença e do óbito (Ehrenkranz *et al.*, 2001).

O programa de vacinação nacional antirrotavírose foi introduzido oficialmente no Peru em 2009, o qual utiliza as duas vacinas disponíveis no mercado, Rotarix™ e RotaTeq™ (MINSA, <http://www.minsa.gob.pe>). Apesar de o programa oficial somente ter sido iniciado no ano de 2009, estas vacinas vinham sendo utilizadas no país, de forma não obrigatória, desde o ano de 2006.

Chang e colaboradores (2015) avaliaram a distribuição e prevalência das infecções por RVA em uma comunidade periurbana no distrito de Independencia, Lima, no período de janeiro de 2008 a maio de 2011. Nesta comunidade a vacina contra rotavírose foi introduzida no início de 2009. O estudo mostrou uma redução significativa da incidência de rotavírose na comunidade (Chang *et al.*, 2015). Embora não haja nenhuma informação em nível nacional dos índices de diarreia por RVA no Peru, parece haver uma tendência de redução da incidência de gastroenterite aguda em geral em todas as três regiões do país de 2008 a 2011 (Grupo Temático de Vigilancia de Enfermedades Diarreicas Agudas y Cólera, 2011)

Contudo, a vigilância epidemiológica da rotavírose humana é incipiente e baseada em 12 hospitais sentinelas, distribuídos em quatro hospitais na capital, Lima, e oito hospitais no interior do país: nas regiões de Arequipa, Cajamarca, Cusco, Junin e Loreto. Estes hospitais, seguindo os parâmetros da OMS e a Organização Pan-americana da Saúde (OPAS), fazem a seleção de amostras de crianças (< 5 anos de idade) hospitalizadas com quadros de diarreia aguda e diagnosticam a rotavírose utilizando o teste de ELISA de captura de antígeno em fezes (Luna, 2008).

Estudos de epidemiologia baseados na vigilância dos genótipos de estirpes de RVA circulantes no Peru são quase inexistentes. No estudo de Cama e colaboradores (1999), realizado no *Instituto Nacional de Salud del Niño*, um hospital que atende crianças carentes da área urbana de Lima, no período de fevereiro de 1995 a fevereiro de 1997, 95 amostras positivas para RVA foram caracterizados por EIA utilizando anticorpos monoclonais para os sorotipos G1 – G4, sendo encontrado G1 (68%), G2 (21%), G4 (3%), G3 (1%) e em 5% das amostras o sorotipo não foi identificado.

Em um estudo mais recente realizado em um hospital sentinela da região de Cajamarca, foi utilizada a metodologia de *multiplex seminested* RT-PCR para o genotipagem de amostras fecais positivas para RVA. Das 117 amostras testadas para RVA, 22 (18.8%) foram positivas por EIA e 42 (35.9%) foram positivas por RT-PCR, deixando evidente que o número de casos de crianças com rotavírus reportados pelos hospitais sentinelas é subestimado. Os

genótipos G mais prevalentes foram G9 (35,7%) e G12 (33,3%), seguidos de G3 (16,7%), G4 (4,8%), G1 (2,4%) e G2 (2,4%). Os genótipos P mais frequentes foram P[6] (45,2%) e P[8] (26,2%), enquanto P[4] foi detectado em dois casos (4,8%). As combinações dos genótipos G-P mais comuns neste estudo foram G12P[6] (23,8%), G9P[6] (19%) e G9P[8] (11,9%); não foi possível identificar os genótipos G e P de 4,8% (2/42) e 23,8% (10/42) das estirpes, respectivamente (Espejo *et al.*, 2014).

Da mesma forma, estudos da epidemiologia molecular da rotavirose nas diferentes espécies animais são praticamente inexistentes, salvo uma única exceção nos camelídeos sul americanos, especificamente em alpacas no departamento de Cusco. Nesta espécie, em 2015, um estudo descreveu a genotipagem parcial de duas estirpes de RVA em alpacas, RVA/Alpaca-tc/Per/K'ayra/3368-10/2011/G3P[11] e RVA/Alpaca-tc/Per/K'ayra/3386-10/2011/G3P[?] para VP7 e VP7 (Garmendia *et al.*, 2015).

#### **1.1.10. Potencial zoonótico das estirpes de RVA**

A transmissão interespecie de RVA já foi considerada um evento raro. Durante a década de 1980, estudos de hibridização RNA-RNA produziram evidências convincentes de que a transmissão interespecie de RVA poderia ocorrer. Estes estudos revelaram uma relação genética muito próxima entre algumas estirpes incomuns de RVA de origem humana e animal (Nakagomi e Nakagomi, 1989, 2000). Utilizando a mesma metodologia, observou-se que outras estirpes detectadas em seres humanos compartilham uma mesma constelação genética com estirpes oriundas de outras espécies (Das *et al.*, 1993; Alfieri *et al.*, 1996; Esona *et al.*, 2009). Coletivamente, estes estudos revelaram que a transmissão direta não é o único mecanismo utilizado para a quebra da barreira interespecie, já que um dos mecanismos descritos em associação a este tipo de transmissão é o reagrupamento, podendo contribuir para o aparecimento de estirpes potencialmente zoonóticas.

Entretanto, à medida que as técnicas de sequenciamento se tornaram amplamente utilizadas, o número de sequências dos genes que codificam VP4 e VP7 das estirpes circulantes de RVA aumentou drasticamente. O acúmulo de informações oriundas das análises dessas sequências e de dados de prevalência das estirpes RVA, revelou que, pelo menos, 3/4 das combinações possíveis dos genótipos G-P detectados em seres humanos podem ser consideradas incomuns, e estas representam uma prevalência global de menos de 1% (Dóro *et al.*, 2015).

Esforços globais de vigilância epidemiológica forneceram evidências sólidas de que os reagrupamentos entre estirpes de RVA de origem humana e animal são cruciais para o intercâmbio de segmentos genéticos entre estes vírus, assim como para a eficiente transmissão e disseminação destas estirpes entre os novos hospedeiros não homólogos. Os exemplos mais proeminentes são as estirpes G9P[8] e G12P[8], que se tornaram globalmente comuns durante o final da década de 1990 e início da década de 2000 (Matthijssens *et al.*, 2010a; Bányai *et al.*; 2012). Os genótipos G9 e G12 destas estirpes emergentes foram provavelmente adquiridos a partir de estirpes de RVA de origem animal, enquanto o outro antígeno de superfície (P) e o restante da constelação genotípica são de origem humana (Gentsch *et al.*, 2005; Santos e Hoshino, 2005). Os genótipos G9 e G12 detectados em suínos, bovinos e humanos, mostram uma constelação genômica derivada de RVA suíno atestando a origem animal destes genes (Teodoroff *et al.*, 2005; Ndze *et al.*, 2013).

Outras estirpes zoonóticas apresentam distribuição geográfica mais restrita. Por exemplo, verificou-se que algumas estirpes pertencentes aos genótipos G6, G8 ou G10, de origem bovina, causam epidemias regionais em humanos, em partes da África, Ásia e Europa, enquanto que em outras áreas são geralmente detectadas de forma esporádica, sem evidências de ligação epidemiológica com a variante epidêmica destes genótipos. Análises moleculares de G6, G8 e G10 revelaram heterogeneidade genética entre as estirpes circulantes, indicando que ocorrem múltiplos eventos de transmissão interespecies independentes em várias áreas geográficas; contudo, apenas algumas destas estirpes em tornaram-se clinicamente importantes em uma determinada área (Martella *et al.*, 2010; Ghosh e Kobayashi, 2011; Dóró *et al.*, 2015).

A questão de por que certos tipos de genótipos de origem animal são mais frequentemente encontrados em seres humanos do que em outras espécies animais permanece aberta. Por exemplo, as combinações de genótipos G-P mais comumente detectados em suínos e bovinos são G5P[7] e G6P[11], respectivamente; estes genótipos foram detectados apenas em alguns poucos casos de infecção em humanos em todo o mundo. Entretanto, os genótipos G3/G9/G4P[6] de suíno e G6/G8/G10P[14] de ruminantes são relativamente mais comuns em seres humanos do que nos respectivos hospedeiros animais (Ghosh e Kobayashi, 2011).

Os mecanismos moleculares responsáveis pela variação antigênica dessas estirpes entre as diferentes espécies hospedeiras permanecem desconhecidos, contudo, alguns estudos têm fornecido informações relevantes que podem auxiliar na compreensão desses fenômenos. Foi levantada a possibilidade de que a composição genética da espécie hospedeira pode

determinar a suscetibilidade dos indivíduos à infecção por determinadas estirpes de RVA e consequentemente, pode favorecer ou inviabilizar a infecção por estirpes heterólogas (Ramig, 1997; Iturriza-Gómara, Desselberger e Gray, 2003; Matthijnssens, Martella e van Ranst, 2010). A VP4 é uma proteína chave neste processo, uma vez que funciona como receptor para a adsorção dos RV à célula. O domínio de ligação ao receptor celular da VP4 interage com porções de carboidratos na superfície celular.

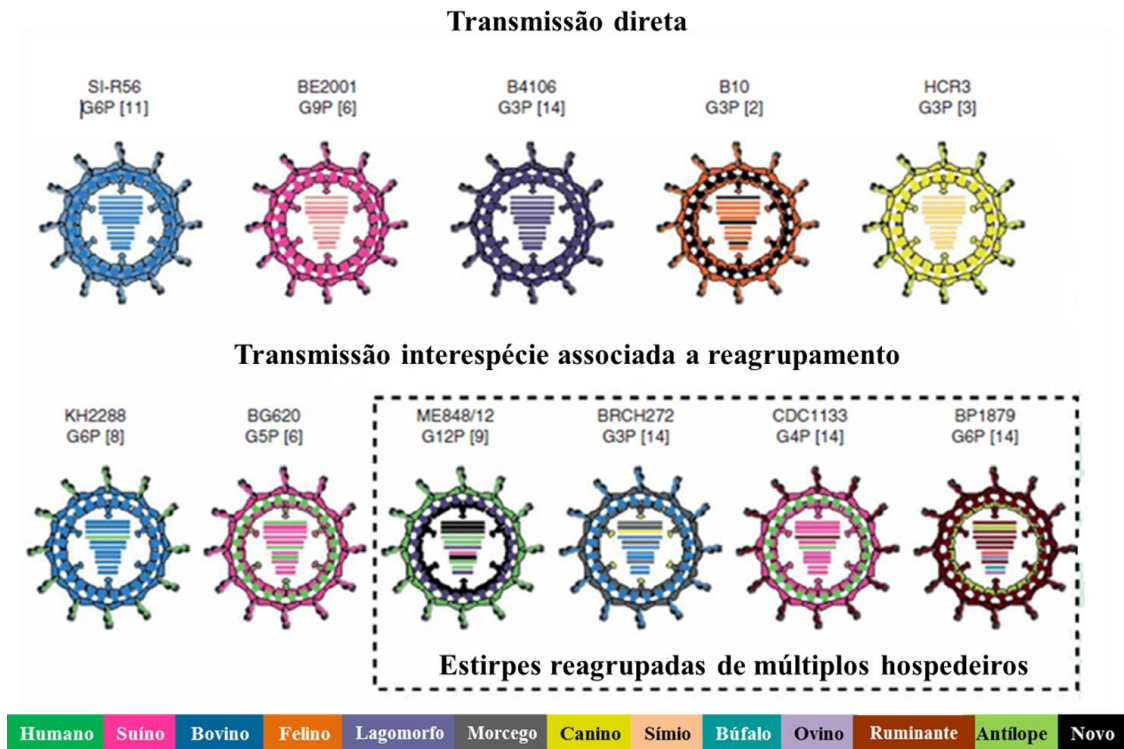
Foi demonstrado que algumas estirpes de RVA de origem animal dependem do ácido siálico para a interação inicial com as células, p.ex.: estirpes P[1] (bovino), P[2] e P[3] (símio) e P[7] (suíno) (Mendez, Arias e Lopez, 1993; Ciarlet e Estes, 1999; Ciarlet *et al.*, 2000). Para algumas estirpes de RVA suínos, o gangliosídeo GM3 sialidado foi proposto como o receptor celular. Estudos recentes indicam que os principais genótipos humanos P[4], P[6] e P[8] não dependem dos ácidos siálicos terminais para a ligação celular, uma vez que são capazes de se ligar aos ácidos siálicos internos presentes nos antígenos do grupo histossanguíneo. A hipótese é que ocorre uma ligação preferencial das estirpes P[4] e P[8] com os antígenos B de Lewis ou antígenos tipo H-1. As crianças com polimorfismo no gene da fucosiltransferase 2 (FUT2), também chamadas de não secretoras da galactosídeo 2-  $\alpha$ -L-fucosiltransferase 2, parecem ser resistentes a infecções por estirpes P[8] (Huang *et al.*, 2012; Imbert-Marcille *et al.*, 2014). Desta forma, para que as crianças sejam suscetíveis à estirpes P[8], os dois fenótipos (secretores FUT2 e antígeno B de Lewis) são necessários, enquanto que as estirpes P[6] infectam principalmente crianças Lewis-negativas, independente de seu fenótipo secretor (Huang *et al.*, 2012; Imbert-Marcille *et al.*, 2014).

Notavelmente, a distribuição desproporcional de indivíduos Lewis-negativos entre as populações (4-6% da população europeia e norte americana *versus* 30% da população africana e latino-americana) poderia explicar a maior frequência de estirpes P[6] entre crianças africanas, enquanto P[4] e P[8] predominam na população caucasiana. Curiosamente, estirpes com genótipos P[9], P[14] e P[25] parecem depender de interações com antígenos histossanguíneos do tipo A para a ligação à superfície celular (Hu *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2012). Consequentemente, os indivíduos portadores de antígeno de tipo A podem ser mais susceptíveis à infecção por estirpes de RVA de origem animal que reconhecem este tipo de antígeno.

As análises comparativas de sequências genômicas demonstraram que a maioria das estirpes de RVA de origem humana pertencem a três constelações genotípicas, dos genes não-G, não-P a saber: I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1 (*Wa-like*), I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2 (*DS-1-like*), and I3-R3-C3-M3-A3-N3-T3-E3-H3 (*AU-1-like*) (Matthijnssens e van

Ranst, 2012). As estirpes humanas *Wa-like* compartilham sua constelação genotípica com estirpes suínas, as estirpes *DS-1-like* compartilham sua constelação genotípica com estirpes de RVA de origem bovina, enquanto as estirpes *AU-1-like* estão relacionadas com estirpes felinas (Gauchan *et al.*, 2015).

Estes estudos revelaram diversos cenários de eventos de transmissão interespécies, frequentemente sugerindo uma configuração do genoma oriunda de múltiplos hospedeiros. Por exemplo, uma estirpe detectada em uma criança com diarreia grave, na Hungria, contém em sua constelação genes oriundos de estirpes de RVA de búfalo, felino e bovino (Bányai *et al.*, 2009). Outra estirpe detectada em uma criança assintomática, no Quênia, carregava genes de provável origem de RV de símio e um número de genes cuja origem não pode ser elucidada (Ghosh *et al.*, 2011). Estirpes de RVA detectadas em crianças na Índia possuem genes provavelmente oriundos de estirpes de felinos, símios e caprinos (Mukherjee *et al.*, 2012). A análise filogenética de várias estirpes com genótipo G4P[6] detectadas na Hungria, sugere uma origem zoonótica destes vírus, possivelmente através do reagrupamento entre estirpes provenientes de suínos e de humanos (Papp, *et al.*, 2013a). Uma estirpe G3P[14] isolada de uma criança australiana apresentou uma mistura de genótipos originário de morcego, felino/canino-*like* e bovino, enquanto uma estirpe detectada em Barbados pode ser produto de reagrupamento entre RVA de humano, de suíno e de bovino (Donato *et al.*, 2014, Tam *et al.*, 2014). Postula-se que os eventos que podem levar ao surgimento deste mosaico genético resultariam de uma possível aquisição sequencial de genes de um *pool* comum de genes circulantes em uma área geográfica em um único hospedeiro ou pela alternância de espécies hospedeiras (**Figura 9**).



**Figura 9.** Constelações genótípicas de estirpes incomuns de RVA de origem humana.

Os dois mecanismos principais são mostrados: transmissão direta e transmissão interespécies associada a reagrupamento, que levam à aquisição de estirpes de RVA de origem animal ou dos seus segmentos genômicos. São também mostradas estirpes decorrentes do reagrupamento entre múltiplos hospedeiros com a presumida espécie hospedeira de origem.

Adaptado de: Dóro *et al.*, 2015.

Conforme delineamos anteriormente, a transmissão zoonótica do RVA está frequentemente associada ao fenômeno de reagrupamento dos segmentos gênicos. Isto exigiria a ocorrência de coinfeção do hospedeiro por estirpes homólogas e heterólogas (Martella *et al.*, 2010). A transmissão de estirpes de RVA heterólogas pode ocorrer diretamente via contato direto com animais, ou indiretamente por contato com fômites contaminados com material fecal. A água contaminada com fezes pode desempenhar um papel chave na transmissão do RVA, pois pode conter estirpes de RVA de origem humana e animal, facilitando assim coinfeções por estirpes homólogas e heterólogas, criando a oportunidade de reagrupamento. Portanto, a transmissão por via hídrica poderia ser uma explicação alternativa para a ocorrência de estirpes de RV com uma constelação genotípica quimérica (Martella *et al.*, 2010; Dóro *et al.*, 2015). Pouco se sabe sobre a transmissão do

RVA por aerossol em condições naturais, embora a transmissão por via aérea tenha sido proposta por trabalhos epidemiológicos iniciais e posteriormente demonstrada por experimentos com animais (Estes e Greengard, 2013; Dóro *et al.*, 2015).



## 2. Justificativa

Apesar do acúmulo de evidências da ocorrência de transmissão interespecíes, estudos epidemiológicos ainda são necessários. Poucos estudos relatam o contato direto ou indireto entre indivíduos infectados com RVA e animais de criação ou de companhia (Zeller *et al.*, 2012; Doan *et al.*, 2013). Por isto quase nada se sabe sobre o modo e frequência da transmissão interespecíes nestes casos. Dado que a vigilância se encontra focada principalmente em pacientes clinicamente doentes e que as estirpes de RVA de origem animal tendem a ser menos virulentas em seres humanos (Ghosh e Kobayashi, 2011, 2014; Dóro *et al.*, 2015), é seguro especular que os casos documentados de eventos de transmissão interespecíes provavelmente representam somente a ponta do *iceberg*. Além disso, as infecções zoonóticas por RVA ocorrem principalmente como eventos espacial e temporalmente separados, e a ligação epidemiológica entre os casos, se houver, permanece oculta. Vale ressaltar que os países em desenvolvimento tendem a relatar mais comumente a ocorrência de verdadeiras infecções associadas à RVA de origem animal em seres humanos do que os países industrializados. O abastecimento inadequado de água potável, a falta de serviços sanitários fundamentais e a coabitação com animais de criação, em países em desenvolvimento, poderiam explicar o maior risco de zoonoses por RV nesses países (Cook *et al.*, 2004). Além disso, não apenas infecções por estirpes de origem animal são mais frequentemente detectadas nesses países, como também as coinfeções por diferentes estirpes de RVA dando lugar à geração e seleção de estirpes com reagrupamentos envolvendo diferentes segmentos gênicos (Ghosh e Kobayashi, 2011, 2014; Dóro *et al.*, 2015; Phan *et al.*, 2016). Conseqüentemente, estas estirpes são mais comumente relatadas em países em desenvolvimento localizados nos continentes africano, asiático e na América latina (Gentsch *et al.*, 2005; Bányai *et al.*, 2012).

Já no Peru, a vigilância epidemiológica do RVA em seres humanos e animais é praticamente inexistente. Não existem dados sobre os genótipos que circulam nas populações rurais que vivem em áreas carentes de serviços básicos e que coabitam com animais de criação e de companhia, além de animais silvestres nos campos de cultivo, florestas e desertos do país.

A zona de criação de alpacas está geograficamente localizada acima dos 4000 masl. Apresenta um clima extremo e de pobre forragem para outras espécies animais que não sejam próprias do planalto andino, embora se possa observar a presença rara de gado tradicional (bovinos, ovinos, equinos e suínos) junto com os pastores, já que estes animais são de

importância econômica fora de sua atividade principal que é a agricultura e criação de CSA domésticos (alpacas e lhamas). Estima-se que no ano 2000, pelo menos um milhão e meio de pessoas das zonas alto andinas dos departamentos de Apurímac, Arequipa, Ayacucho, Cusco, Huancavelica, Junín, Lima e Puno, se dedicavam à criação de CSA como atividade principal. Contudo, a renda per capita nestas zonas produtoras de camelídeos são as menores do país (FAO, 2005).

A situação econômica das comunidades camponesas como Silli, que estão dedicadas à criação de CSA, é caótica pela extrema pobreza que padecem, ficando ainda mais crítica sua situação pela falta de água potável, falta de serviços higiênicos vitais e de centros de saúde. Tudo isso é refletido na condição sanitária de seus animais, que sofrem maiores problemas sanitários, pelo manejo inadequado e por falta de programas profiláticos. O tipo de criação dos CSA nas comunidades é extensivo, utilizando zonas pantanosas regadas por riachos ou rios, e com um sistema de trabalho da época dos Incas denominado de *minka* (trabalho coletivo feito a favor da comunidade). Em outras palavras, as famílias que compõem as comunidades ficam encarregadas do pastoreio e cuidado dos animais no mínimo uma temporada durante o ano, e pelo observado, os pastores em sua maioria são crianças, mulheres e pessoas idosas. O contato dos pastores com os animais é muito estreito e estes têm o hábito de utilizar suas fezes como fertilizantes, assim como combustível para cozinhar, e as crianças menores até brincam com as fezes secas.

Por outro lado, os animais do instituto de pesquisa do IVITA têm um sistema de criação semi-intensiva, são animais em condições sanitárias superiores quando comparados aos animais das comunidades rurais. Possuem mão de obra contratada junto com suas famílias para cuidar os animais, que trabalham em sistema de rodízio ao longo do ano. Os animais do IVITA ficam a 30 km de distância dos animais do Silli e não deveriam ter contato nenhum entre eles, contudo, durante as visitas de coletas observamos que os médicos veterinários encarregados do IVITA e seus trabalhadores, prestam atendimento, na ocorrência de epidemias com alta taxa de morbidade e mortalidade de animais, nas comunidades como Silli, e quando voltam aos currais do IVITA não fazem a devida esterilização das roupas, botas e ferramentas de trabalho.

Por estas razões tomamos amostras da comunidade camponesa de Silli e do IVITA para compará-las e saber se existem diferenças na circulação das estirpes de RVA entre ambos os locais, assim como para verificar se o tipo de manejo sanitário dos animais influencia na ocorrência e na incidência das infecções por RVA na região.

Os dados anteriores obtidos por nosso grupo sugeriram que as estirpes de RVA que circulam em alpacas de uma comunidade camponesa em Cusco, possuem um mosaico genético peculiar, nos levando a especular que estas estirpes possam ter emergido a partir de eventos de reagrupamento entre RVA de origem humana e animal, sugerindo uma característica zoonótica da infecção (Rojas, 2013). A genotipagem e sequenciamento completo ou parcial do genoma das estirpes de RVA, que circulam no planalto andino infectando ambas as populações, permitiria um melhor entendimento da frequência, evolução e da ecologia das infecções por RVA na região estudada e sua verdadeira importância como agente zoonótico. Além de proporcionar um parâmetro de comparação com as constelações genóticas das duas vacinas de RVA utilizadas pelo Ministério da Saúde do Peru.

### 3. Objetivos

#### 3.1. Objetivo Principal

O objetivo principal deste estudo foi realizar a detecção e genotipagem das estirpes de RVA provenientes de amostras fecais de animais e seres humanos que coabitam estreitamente, coletadas especificamente da zona de criação de alpacas do distrito de Maranganí no departamento de Cusco, no Peru, no período 2010-2014.

#### 3.2. Objetivos Específicos

1. Detectar infecções por RVA, utilizando a RT-PCR, em amostras fecais de camelídeos, carneiros e seres humanos, nativos da serra sul do Peru.
2. Identificar os genótipos das estirpes de RVA detectadas, através de *multiplex seminested* RT-PCR e por sequenciamento parcial do genoma viral, com base em pelo menos 3 genes: VP7, VP4, e/ou VP6 e/ou NSP4 e/ou NSP5.
3. Isolamento em cultura de células de estirpes contendo possíveis novos genótipos e sequenciar o genoma completo destas estirpes.
4. Avaliar a frequência dos diferentes genótipos identificados entre as espécies estudadas.
5. Avaliar a ocorrência de infecções interespecies na população estudada.

## **4. Materiais e Métodos**

### **4.1. Questões éticas**

O presente estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa em animal da Universidad Nacional Mayor de San Marco da Facultad de Medicina Veterinaria (UNMSM-FMV), Lima, Peru e, pelo Instituto Veterinário de Investigaciones Tropicales y de Altura (IVITA), Cuzco, Peru. Para a obtenção das amostras das crianças foi solicitado a todos os pais dos indivíduos convidados a participar do estudo, uma autorização para coleta de espécime clínico, utilizando-se para tal um Termo de Consentimento proporcionado pelo IVITA. A importação das amostras fecais de seres humanos e animais foi aprovada pelo Instituto do Meio Ambiente Brasileiro (IBAMA; Brasília, DF, Brasil) mediante uma autorização com número de protocolo 14BR012948/DF 02/20/2014.

### **4.2. Tipo de estudo**

Trata-se de um estudo de série de casos de caráter observacional transversal descritivo, tendo por objetivo descrever a ocorrência de dois eventos (1) circulação de RVA e (2) ocorrência de eventos de transmissão interespecies, em um determinado instante do tempo em populações distintas, compostas de seres humanos e animais nativos da região do planalto andino no Peru.

### **4.3 População e amostras**

A população alvo foi aquela de animais e crianças com ou sem diarreia aguda, residentes na área do estudo.

### **4.4. Critérios de inclusão e exclusão**

#### **4.4.1. Critério de inclusão**

Crianças os quais os responsáveis concordaram em participar do estudo do estudo e animais que os proprietários autorizaram a coleta, com ou sem quadros de diarreia aguda residentes na área do estudo.

#### **4.4.2. Critérios de exclusão**

Crianças os quais os não responsáveis concordaram em participar do estudo do estudo e animais que os proprietários não autorizaram a coleta, com ou sem quadros de diarreia aguda residentes na área do estudo.

#### 4.5. Coleta de amostras

Foram coletadas 265 amostras fecais: 24 de crianças, 192 de alpacas neonatas, 40 de lhamas neonatas e nove de carneiros, com ou sem diarreia, localizados na zona de criação de alpacas ( $14^{\circ}24'45.3''\text{S}$ ,  $71^{\circ}11'32.6''\text{W}$ ;  $\sim 4000$  masl (metros acima do nível do mar, do inglês *metres above sea level*) do distrito de Maranganí, província de Canchis, no departamento de Cusco, Peru (**Tabela 3**). Por se tratar de série de casos, as amostras foram de conveniência. Os sujeitos (humanos ou animais) que atenderam aos critérios de inclusão nos dias e horários em que houve coleta de dados participaram do estudo. As coletas foram realizadas entre os meses de janeiro e fevereiro de cada ano, no período entre 2010-2014. Os meses das coletas coincidem com o período de nascimento das alpacas e lhamas, e de maior incidência de diarreia em crianças e animais na região.

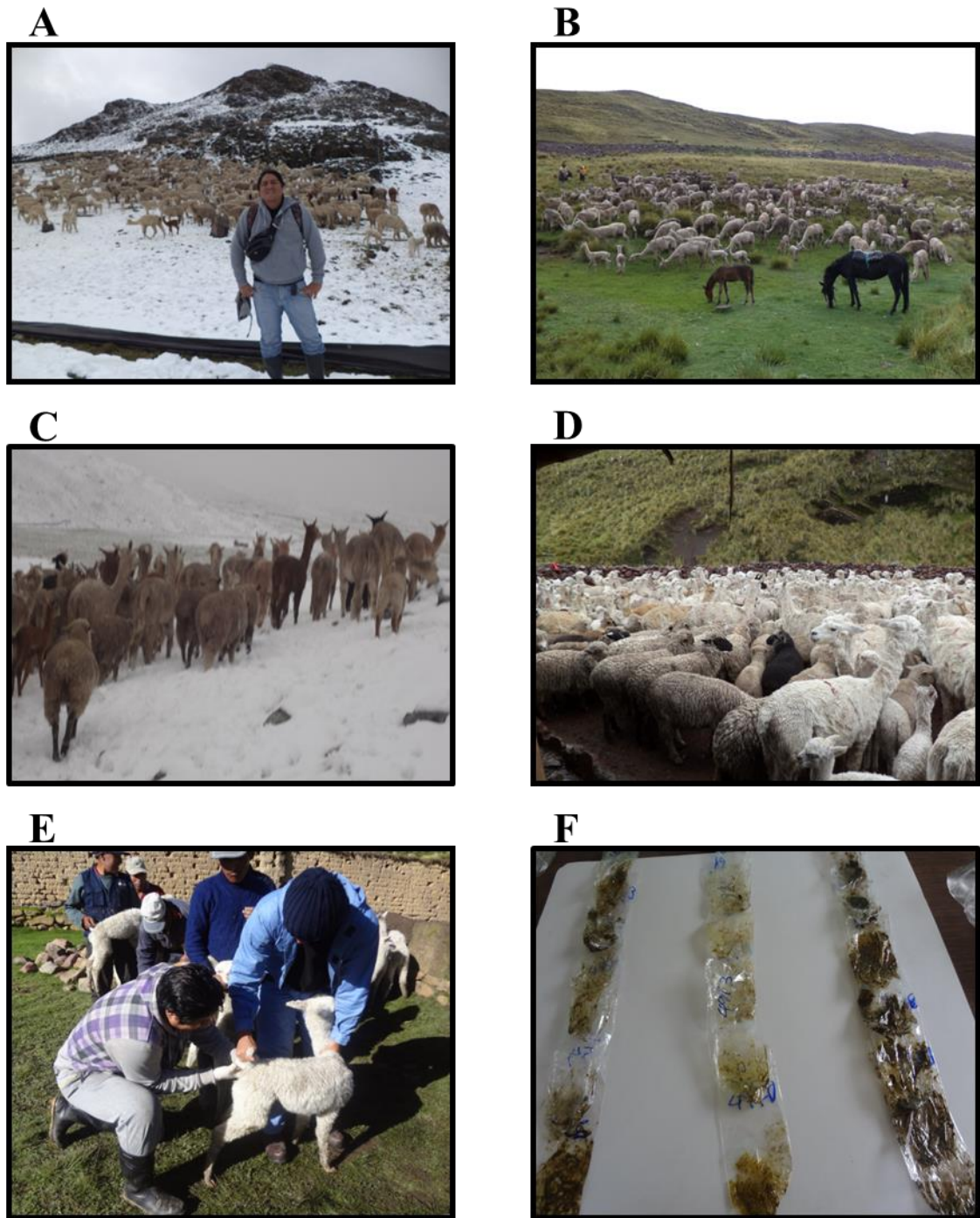
As amostras de humanos e animais são oriundas de dois centros de criação de camelídeos localizados na comunidade camponesa de Silli e no centro de pesquisa de alpacas do IVITA pertencente à FMV-UNMSM. A distribuição das amostras por sítio de coleta está apresentada na **Tabela 3**.

**Tabela 3.** Descrição das amostras fecais que foram analisadas neste estudo.

<b>Ano</b>	<b>Espécie</b>	<b>Sítio de coleta<sup>1</sup></b>	<b>Faixa etária</b>	<b>Status</b>	<b>Nº de amostras</b>
<b>2010</b>	Alpacas	Silli	1 - 5 semanas	Com diarreia	50
	Humanos		2 - 13 anos	Com diarreia	14
<b>2012</b>	Alpacas	IVITA	1 - 5 semanas	Com diarreia	28
				Sem diarreia	40
<b>2014</b>	Alpaca	Silli	1 - 5 semanas	Com diarreia	22
				Sem diarreia	22
		IVITA	1 - 5 semanas	Com diarreia	8
				Sem diarreia	22
	Lhama	Silli	1 - 5 semanas	Sem diarreia	11
				IVITA	Com diarreia
			1 - 5 semanas	Sem diarreia	27
	Carneiros	Silli	3 - 6 meses	Sem diarreia	4
				IVITA	3 meses
	Humanos	Silli	1,6 - 6 anos	Com diarreia	1
Sem diarreia				1	
IVITA				2 - 13 anos	Com diarreia
			Sem diarreia	4	
<b>Total</b>					<b>265</b>

<sup>1</sup> Silli = Comunidade camponesa de Silli; IVITA = Instituto Veterinário de Investigaciones Tropicales y de Altura.

No caso das amostras de animais, todas foram colhidas diretamente do reto dos animais reunidos no curral (**Figura 10**). Em crianças, foram colhidas pelos pais utilizando os coletores fornecidos para este fim. As amostras foram encaminhadas ao laboratório de diagnóstico microbiológico do IVITA (Cusco-Peru) onde foram mantidas congeladas (-20°C) até o final da coleta. Posteriormente as amostras foram levadas para o Laboratório de Virologia Veterinária da FMV-UNMSM (Lima-Peru) e preservadas a -80°C para posteriormente serem trazidas para Laboratório de Virose Respiratórias, Entéricas e Oculares (LAVIREO) do Departamento de Virologia, do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da UFRJ para seu processamento.



**Figura 10.** Coleta das amostras fecais das espécies animais.

(A, B) Montanhas do departamento de Cusco (Distrito de Marangani) a 4300 masl onde foi realizada a coleta de fezes dos animais de criação extensiva e semi-intensiva pertencentes a Silli e ao IVITA, respectivamente; (C) Pastoreio dos animais até os currais de manejo; (D) Curral de manejo; (E) Coleta de fezes de animais com e sem diarreia; (F) As fezes foram classificadas e congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até seu envio à UFRJ-Brasil.



#### 4.6. Processamento das amostras fecais

Inicialmente, as amostras sofreram um processo de clarificação. Para tal, foram preparadas suspensões fecais 10-20% em PBS (tampão salina fosfato, do inglês *phosphate-buffered saline*) pH 7.2, para depois serem submetidas a centrifugação a 2500x g por 5 minutos. O sobrenadante fecal clarificado foi utilizado para a extração do RNA viral.

#### 4.7. Controles positivos

Com o objetivo de testar e padronizar os novos oligonucleotídeos desenhados para este estudo foram utilizadas quatro estirpes de RVA de alpacas e suas sequências nucleotídicas previamente obtidas RVA/Alpaca-wt/PER/Alp11A/2010/G8P[?], RVA/Alpaca-wt/PER/Alp11B/2010/G20P[?], RVA/Alpaca-wt/PER/Alp21A/2010/G1P[?], RVA/Alpaca-wt/PER/Alp22/G8P[14]. O desenho dos iniciadores foi um requisito fundamental devido a ao fato de que os oligonucleotídeos disponíveis na literatura para a detecção e genotipagem de RVA em humanos e animais apresentam uma eficiência limitada na detecção das estirpes de camelídeos (Rojas, 2013).

#### 4.8. Extração do RNA viral

A extração do RNA viral foi realizada utilizando o kit *Totally RNA Kit* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos) de acordo com as recomendações do fabricante. Em tubos de 1,5 mL adicionou-se 300 µL da solução desnaturante juntamente com 300 µL da suspensão fecal e 300 µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico. Em seguida os tubos foram agitados em vórtex por 15 segundos. Posteriormente foram incubados em gelo por 5 minutos e após esse tempo os tubos foram centrifugados a 10000x g por 5 minutos. Após a centrifugação a fase aquosa foi transferida para outro tubo onde foram adicionados 60 µL de acetato de sódio e 300 µL de fenol ácido. Os tubos foram agitados em vórtex por 15 segundos. Em seguida, os tubos foram novamente incubados em gelo por 5 minutos e após esse período foram centrifugados a 10000x g por 5 minutos. Após a centrifugação a fase aquosa foi transferida para outro tubo e adicionou-se 600 µL de isopropanol. Em seguida os tubos foram incubados a -20°C por 15 minutos. Após esse período foi feita uma centrifugação a 12000x g por 15 minutos, o sobrenadante foi desprezado por inversão dos tubos e foi adicionado 300 µL de etanol 70% à temperatura ambiente em cada tubo. Os tubos foram homogeneizados por inversão e centrifugados a 12000x g por 10 minutos; o sobrenadante foi desprezado por inversão dos tubos e o sedimento de RNA foi seco a vácuo (*Speed Vacuum*

*Concentrator*, Thermo Fisscher, Waltham, MA, Estados Unidos). Por fim, o sedimento foi suspenso com 30  $\mu\text{L}$  em água contendo DEPC (dietil etilenodiamino, do inglês *diethylcarbonate*) /EDTA (ácido tetra acético etilenodiamino, do inglês *ethylenediamine tetraacetic acid*) fornecida no kit.

#### 4.9. Detecção de RVA

As amostras foram submetidas à RT-PCR e *(semi)nested* PCR utilizando oligonucleotídeos específicos para as amplificações dos genes que codificam as proteínas VP6, NSP4 e NSP5 dos RVA. Inicialmente produziu-se o DNA complementar (cDNA); (ácido desoxirribonucleico complementar, do inglês *complementary deoxyribonucleic acid*) como descrito a seguir. Posteriormente, 5  $\mu\text{L}$  do cDNA foram misturados a 45  $\mu\text{L}$  da mistura de PCR descrita posteriormente.

##### 4.9.1. Produção do DNA complementar viral (cDNA)

Primeiramente foi feita a transcrição reversa (RT, do inglês *reverse transcription*) para a produção do cDNA utilizando iniciadores antissenso específicos (**ver Quadro S1, material suplementar**), separadamente para cada gene pesquisado. Para tal, foi adicionado em um tubo de PCR 5  $\mu\text{L}$  do RNA extraído e aquecido a 97°C por 5 minutos. Após este período, resfriou-se a mistura por 5 minutos a 4°C e adicionou-se 5  $\mu\text{L}$  da seguinte mistura: 1,4  $\mu\text{L}$  de água estéril; 0,5  $\mu\text{L}$  da mistura de desoxinucleotídeos trifosfato 10 mM (dNTP) (contendo desoxiadenosina trifosfato [dATP], desoxitimina trifosfato [dTTP], desoxicitidina trifosfato [dCTP] e desoxiguanosina trifosfato [dGTP]; concentração final 0,5 mM) (Ludwig Biotec, Porto Alegre, RS); 2  $\mu\text{L}$  de tampão da enzima concentrado 5X; 0,6  $\mu\text{L}$  de solução de cloreto de magnésio (50 mM; concentração final 3 mM), 0,4  $\mu\text{L}$  da solução iniciadores específicos antissenso (20  $\mu\text{M}$ ; concentração final 80 pmol) e 0,2  $\mu\text{L}$  (10 U) da enzima transcriptase reversa (*ImProm-II Reverse Transcriptase*, Promega, Madison, WI, Estados Unidos). As reações ocorream em um termociclador modelo *Veriti 96 wells* (Thermo Fisher Scientific), em uma temperatura inicial de 25°C por 5 minutos, seguida de uma temperatura de 42°C por 45 min. Os cDNA obtidos foram submetidos à reação de PCR como descrito a seguir.

##### 4.9.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR) e *(semi)nested* PCR

Para as PCR foram adicionados ao cDNA produzido, 45  $\mu\text{L}$  da seguinte mistura: 30  $\mu\text{L}$  de água destilada estéril; 10  $\mu\text{L}$  de tampão da enzima concentrado 5X; 2  $\mu\text{L}$  de solução de

cloreto de magnésio (50 mM; concentração final 2 mM), 1 µL da mistura de dNTPs (10 mM; concentração final 0,2 mM); 1,6 µL da solução contendo os iniciadores senso e antissenso específicos (20 µM; concentração final 32 pmol) e 0,4 µL (2 U) da enzima *Taq* polimerase (Ludwig Biotec, Porto Alegre, RS). Na *seminested* PCR 5 µL do produto da primeira PCR foram adicionados 45 µL da mesma mistura de PCR utilizando-se iniciadores específico senso e antissenso (ver **Quadro S1**). As amplificações foram realizadas em termociclador modelo *Veriti 96 wells*, (Thermo Fisher Scientific). As condições da PCR e (*semi*)*nested* PCR para cada um dos genes pesquisados estão apresentadas no **Quadro S2**.

A análise dos resultados das reações de PCR foi realizada por eletroforese em gel de agarose. Ao gel de agarose a 1,2% em TBE 0,5X (Tris 0,089 M; ácido bórico 0,0089 M; EDTA 0,025 M, pH 8,3) acrescido de 5 µL de brometo de etídio (0,5 µg/µL), foram aplicados 5 µL do produto da PCR ou da (*semi*)*nested* PCR e submetido em seguida à eletroforese a 100V por 1 hora com tampão TBE 0,5X. Por fim, os géis foram visualizados em um transiluminador com luz ultravioleta e fotografado com câmera digital. O tamanho do fragmento amplificado foi estimado por comparação com um padrão de tamanho molecular 100 pares de base (pb) (Ludwig Biotec).

#### **4.10. Genotipagem das amostras positivas para RVA**

As amostras positivas para RVA foram subsequentemente analisadas por sequenciamento ou multiplex RT-PCR para determinação dos genótipos G (VP7), P (VP4), I (VP6), E (NSP4) e H (NSP5).

##### **4.10.1. Genotipagem através de sequenciamento do genoma viral**

Para a seleção e desenho dos oligonucleotídeos foram utilizadas quatro estirpes de RVA de alpacas detectadas previamente em nosso laboratório: RVA/Alpaca-wt/PER/Alp11A/2010/G8P[x], RVA/Alpaca-wt/PER/Alp11B/2010/G20P[x], RVA/Alpaca-wt/PER/Alp21A/2010/G1P[x] e RVA/Alpaca-wt/PER/Alp22/G8P[14]. Utilizando as sequências parciais obtidas destas estirpes, além de sequências comumente descritas para os genótipos I, E e H de estirpes de origem humana e animal da ordem *Artiodactyla*, foram selecionados os iniciadores para a amplificação dos genes que codificam a VP7, VP4, VP6, NSP4 e NSP5.

Os iniciadores selecionados amplificam regiões genômicas hipervariáveis dos genes que codificam as proteínas VP7 e VP4 que permitem a identificação das diferentes variantes

genéticas descritas na literatura (**Quadro S3**). Já para a VP6, foram selecionados iniciadores que amplificam a ORF completa deste gene (**Quadro S3**) com base no alinhamento das sequências de RVA obtidas no *GenBank*, utilizando-se o programa MegAlign (pacote Lasergene; DNASTAR Inc., Madison, WI, Estados Unidos). Cabe mencionar que para os genes que codificam as proteínas não estruturais NSP4 e NSP5 foram utilizados os mesmos iniciadores da PCR ou *seminested* PCR que amplificam a ORF completa destes genes (**Quadro S1**). As condições das amplificações estão descritas no **Quadro S4**.

Os segmentos genômicos amplificados de estirpes randomicamente selecionadas foram enviados para sequenciamento pelo método de Sanger na empresa MacroGen Inc (Seul, Coreia), de acordo com o protocolo próprio da empresa.

#### 4.10.1.1. Análise das Sequências

As sequências nucleotídica obtidas foram editadas utilizando os programas Chromas v.2.5.1 [Technelysium Pty Ltd, Helensvale, QLD - Austrália], SeqMan e EditSeq do pacote do software Lasergene v.7.0 [DNASTAR Inc., Madison, WI, EUA]. Posteriormente foram analisadas através do programa BLAST [www.ncbi.nlm.gov/BLAST] para identificação das sequências mais próximas, e alinhadas com sequências correspondentes obtidas do *GenBank*, utilizando o algoritmo MegaAlign do pacote do software Lasergene v.7.0 [DNASTAR Inc., Madison, WI, EUA]. O alinhamento é um procedimento computacional que faz correspondência entre as posições de sequências moleculares mantendo a ordem destas (Nahum e Ruiz, 2015).

A identificação dos diferentes genótipos foi realizada utilizando a ferramenta RotaC<sup>2.0</sup> *automated genotyping tool for Group A rotaviruses* (<http://rotac.regatools.be>) (Maes *et al.*, 2009).

As análises filogenéticas foram realizadas utilizando o programa MEGA v.7.0.14 (Kumar, Stecher e Tamura, 2016). As distâncias de identidade de nucleotídeos foram corrigidas usando *Kimura 2-parameter*, modelo padrão utilizado pela RCWG para as análises de sequências de RVA.

Os dendrogramas foram construídos pelo método de *Maximum Likelihood* (*máxima verossimilhança*), (A máxima verossimilhança é um método semelhante ao de máxima parcimônia no que diz respeito à atribuição de um *score* às diferentes topologias a serem

comparadas, porém trata-se de um método probabilístico. O método de máxima verossimilhança busca a árvore que maximiza a probabilidade dos dados observados. Neste método, calculam-se as probabilidades associadas a diferentes topologias e cada uma delas com as variações nos tamanhos dos ramos, considerando o modelo evolutivo escolhido. A árvore ótima é aquela com maior valor de verossimilhança, ou seja, maior probabilidade de os resultados terem se originado conforme o modelo de substituição de nucleotídeos ou de aminoácidos. Este é considerado um método de maior consistência e robustez, porém apresenta algumas desvantagens. Por ser um método complexo, tem um alto custo computacional, o que pode limitar as análises de bases de dados contendo um grande número de sequências. Além disso, é particularmente sensível a ambiguidades presentes no alinhamento) (Walsh e Sharma, 2009; Nahum e Ruiz, 2015).

A significância estatística foi estimada pela análise de *bootstrap* com 1000 pseudoreplicatas. Esta metodologia usa reamostragem aleatória de dados com a substituição para determinar o intervalo de confiança para um parâmetro da árvore. As reamostragens são comparadas e cada nó recebe um valor em porcentagem que indica quão frequente as duas sequências ou o grupo de sequências ocorrem juntas nas diferentes árvores (Walsh e Sharma, 2009; Nahum e Ruiz, 2015). Na prática, valores de *bootstrap* superiores a 75% são considerados um apoio significativo para um clado (Walsh e Sharma, 2009).

#### **4.10.2. Genotipagem através da reação de *multiplex seminested* PCR**

Uma vez que foram obtidas sequências específicas dos genótipos circulantes na região do estudo, foram selecionados novos iniciadores tipo-específicos para serem utilizados na genotipagem das estirpes (**Quadros S5**). As reações de amplificação foram realizadas como descrito anteriormente, e as condições estão especificadas no **Quadro S6**. A análise dos resultados das reações de PCR foi realizada por eletroforese em gel de agarose visualizado em um transiluminador com luz ultravioleta e fotografado com câmera digital. O tamanho do fragmento amplificado foi estimado por comparação com um padrão de tamanho molecular 100 pb (Ludwig Biotec).

#### **4.11. Isolamento de RVA em cultura de células**

Após o resultado do sequenciamento parcial do gene da VP4 da estirpe de alpaca RVA/Alpaca-tc/PER/SA44/2014G3P[?], observou-se que possivelmente tratava-se de um

novo genótipo P e, portanto, seria necessário sequenciar a OFR completa e submeter a sequência ao RCWG para confirmação. Devido a pequena quantidade de material fecal disponível, optamos por tentar realizar o isolamento desta estirpe em cultura de células.

Inicialmente, foi feita a descontaminação da suspensão fecal 10% (v/v) em meio mínimo essencial de Eagle (MEM, do inglês *Eagle's minimum essential medium*) (Thermo Fischer Scientific) suplementado com penicilina e estreptomicina (concentração final de 200U/mL) e fungizona (concentração final de 5 µg/mL -Thermo Fischer Scientific), que foi clarificada por centrifugação à 2500x g por 5 minutos. O sobrenadante foi filtrado em filtros do tipo Millex<sup>®</sup> com poros de 0.22 µm (Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha), tratado com 10 µg/mL de tripsina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) a 37°C/30 minutos, com a finalidade de clivagem das espículas, facilitando a penetração das partículas virais nas células, e inoculadas em culturas de células de macaco verde africano (MA-104) mantidas em MEM-Eagle adicionado com 1 µg/ml de tripsina, e mantidas a 37°C em atmosfera de 5% CO<sub>2</sub>. A cultura foi examinada diariamente, e quando se observou o efeito citopático (CPE, do inglês *cytopathic effect*) em aproximadamente 75% da cultura de células, estas foram congeladas e descongeladas uma vez, o lisado foi tratado com 10 µg/mL tripsina e reinoculado em MA-104, conforme descrito anteriormente. O procedimento foi repetido três vezes. Os sobrenadantes da 3ª passagem foram corados com ácido fosfotúngstico a 2% e examinados por microscopia eletrônica de transmissão (TEM, do inglês *transmission electron microscopy*) (Tecnai G2 espírito; Thermo Fisher Scientific/FEI companhia; Hillsboro, OR, EUA) para confirmação do isolamento viral.

Como a metodologia de evidenciação da propagação viral foi a observação de CPE, o controle de células (controle negativo – células não infectadas) também foi cultivado na presença de tripsina 1µg/ml, com o objetivo de evitar resultados falso positivos.

O isolado viral foi caracterizado pelo sequenciamento dos 11 segmentos genômicos. Os iniciadores utilizados para sequenciamento estão listados no **Quadro S7**.

#### **4.12. Análise Estatística**

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o cálculo de Chi-quadrado para associação de variáveis. A significância estatística foi acessada por p-valor <0,05.

## 5. Resultados

### 5.1. Detecção de infecções por RVA, em amostras fecais de camelídeos, carneiros e seres humanos nativos da serra sul do Peru

Para a detecção de RVA todas as amostras fecais foram submetidas à amplificação por RT-PCR utilizando-se iniciadores específicos para três segmentos genômicos distintos: VP6, NSP4 e NSP5. Este procedimento foi realizado devido à baixa taxa de sucesso da maioria dos iniciadores comumente utilizados para a detecção e genotipagem de RVA em alpacas peruanas (Rojas, 2013; Garmendia *et al.*, 2015). Desta forma, a pesquisa de diferentes genes aumenta a sensibilidade da análise reduzindo resultados falsos-negativos e evitando subestimar a real incidência do RVA na região do estudo.

Das 265 amostras de fezes coletadas das diferentes espécies estudadas, 91 (34,3%) foram positivas para RVA. Observamos que os iniciadores que amplificam a NSP5 apresentaram a melhor performance com 100% (91/91) de sensibilidade, seguido dos iniciadores para NSP4, 88% (80/91) e para VP6, 44% (40/91).

Não houve diferença significativa na positividade observada nos diferentes sítios de coleta ( $p = 0,448$ ). Foram detectadas amostras positivas durante todo o período do estudo, entre todas as espécies estudadas e entre indivíduos sintomáticos e assintomáticos (**Tabela 4**).

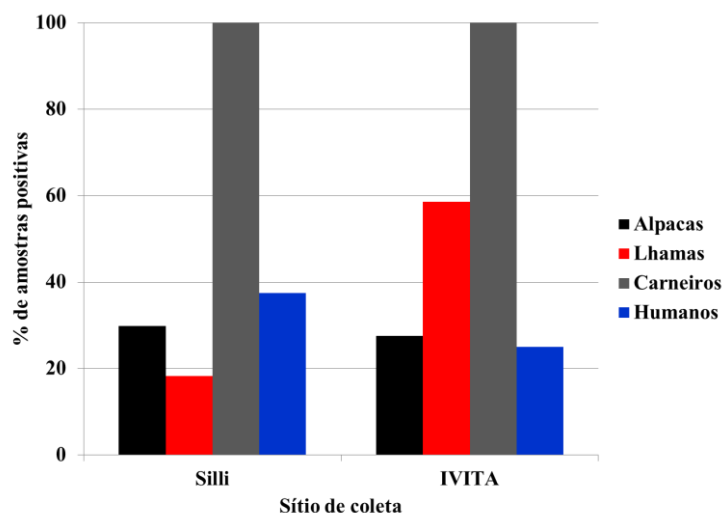
A incidência da infecção por RVA entre as diferentes espécies foi similar, entre os dois sítios de coleta, exceto para as lhamas onde foi observada uma positividade significativamente mais elevada entre os animais do IVITA ( $p = 0,022$ ). Os percentuais de amostras positivas, por espécies hospedeiras e sítio de coleta estão apresentados na **Figura 11**. No geral, a distribuição das amostras positivas entre as diferentes espécies foi 20,3% (39/192) positividade entre as alpacas, 47,5% (19/40) entre as lhamas, 100% (9/9) entre os carneiros e 33,3% (8/24) entre os humanos.

**Tabela 4.** Distribuição geral das amostras positivas para RVA entre as diferentes espécies hospedeiras analisadas no período 2010-2014.

Ano	Espécie	Sítio de coleta <sup>1</sup>	Status	Nº de amostras testadas	Nº de amostras positivas
<b>2010</b>	Alpacas	Silli	Com diarreia	50	17
	Humanos		Com diarreia	14	4
<b>2012</b>	Alpacas	IVITA	Com diarreia	28	8
			Sem diarreia	40	3
<b>2014</b>	Alpaca	Silli	Com diarreia	22	6
			Sem diarreia	22	5
		IVITA	Com diarreia	8	5
			Sem diarreia	22	11
	Lhama	Silli	Sem diarreia	11	2
			IVITA	Com diarreia	2
		IVITA	Sem diarreia	27	15
			Carneiros	Silli	Sem diarreia
		IVITA	Sem diarreia	5	5
			Humanos	Silli	Com diarreia
Sem diarreia	1	1			
	IVITA	Com diarreia	4	1	
		Sem diarreia	4	1	
<b>Total</b>				<b>265</b>	<b>91 (34,3%)</b>

<sup>1</sup> Silli = Comunidade camponesa de Silli; IVITA = Instituto Veterinário de Investigaciones Tropicales y de Altura.





**Figura 11.** Percentual de amostras fecais positivas para RVA, por sítio de coleta, entre as diferentes espécies estudadas.

Silli = Comunidade camponesa de Silli; IVITA = Instituto Veterinário de Investigaciones Tropicales y de Altura. Na comunidade de Silli 29,9% (28/44) das amostras de alpaca, 18,2% (2/1) de lhamas, 100% (4/4) de carneiros e 37,5% (6/16) de humanos foram positivas para RVA. Dentre as amostras do IVITA 27,6% (27/98) das amostras de alpaca, 58,6 (17/29) de lhamas, 100% (5/5) de carneiro e 25% (2/8) de humanos foram positivas para RVA.

## 5.2. Identificação dos genótipos das estirpes de RVA detectadas

### 5.2.1. Identificação dos genótipos G (VP7), P (VP4), I (VP6), E (NSP4) e H (NSP5) por sequenciamento

A opção de genotipagem por sequenciamento inicialmente deveu-se ao fato de que os iniciadores descritos na literatura para a amplificação dos diversos genótipos G, P, I, E e H, não funcionarem adequadamente para amostras de camelídeos (Rojas, 2013; Garmendia *et al.*, 2015).

Foi obtida a amplificação, de pelo menos um gene, de 55 estirpes de RVA detectadas neste estudo (oito estirpes detectadas em humanos, 38 de camelídeos [21 de alpacas e 17 de lhamas] e nove de ovinos), os quais foram sequenciados. As sequências foram analisadas utilizando a ferramenta RotaC<sup>2.0</sup> que permite a rápida identificação dos 11 segmentos genômicos de RVA de acordo com as diretrizes do RCWG.

Para evitar contaminação cruzada as reações de amplificação das estirpes de diferentes espécies foram realizadas em dias diferentes. Também não foram utilizados controles positivos durante as reações de RT-PCR. Finalmente, após a obtenção das sequências, estas

foram comparadas às sequências das estirpes de referência pertencentes ao LAVIREO. Não foi observada a ocorrência de contaminação cruzada em nossos experimentos.

Para as análises filogenéticas as sequências obtidas neste estudo foram alinhadas com sequências de referência de todos os genótipos de RVA disponíveis no *GenBank*. Entretanto, para tornar a árvore final menos “poluída” e mais didática decidimos reduzir o número de amostras de referência. Os resultados, contudo, permaneceram inalterados.

#### **5.2.1.1. Identificação dos genótipos G (VP7)**

Foram obtidas sequências do gene que codifica a VP7 de 15 estirpes detectadas em alpacas, 10 de lhamas, duas de carneiros e seis de humanos. Foram identificados os genótipos G1(alpaca, lhama e carneiro), G3 (alpaca, lhama e humano), G8 (alpaca) e G20 (alpaca). Uma amostra de alpaca apresentou coinfeção de duas estirpes pertencentes aos genótipos G3 e G8 (**Figura 12**).

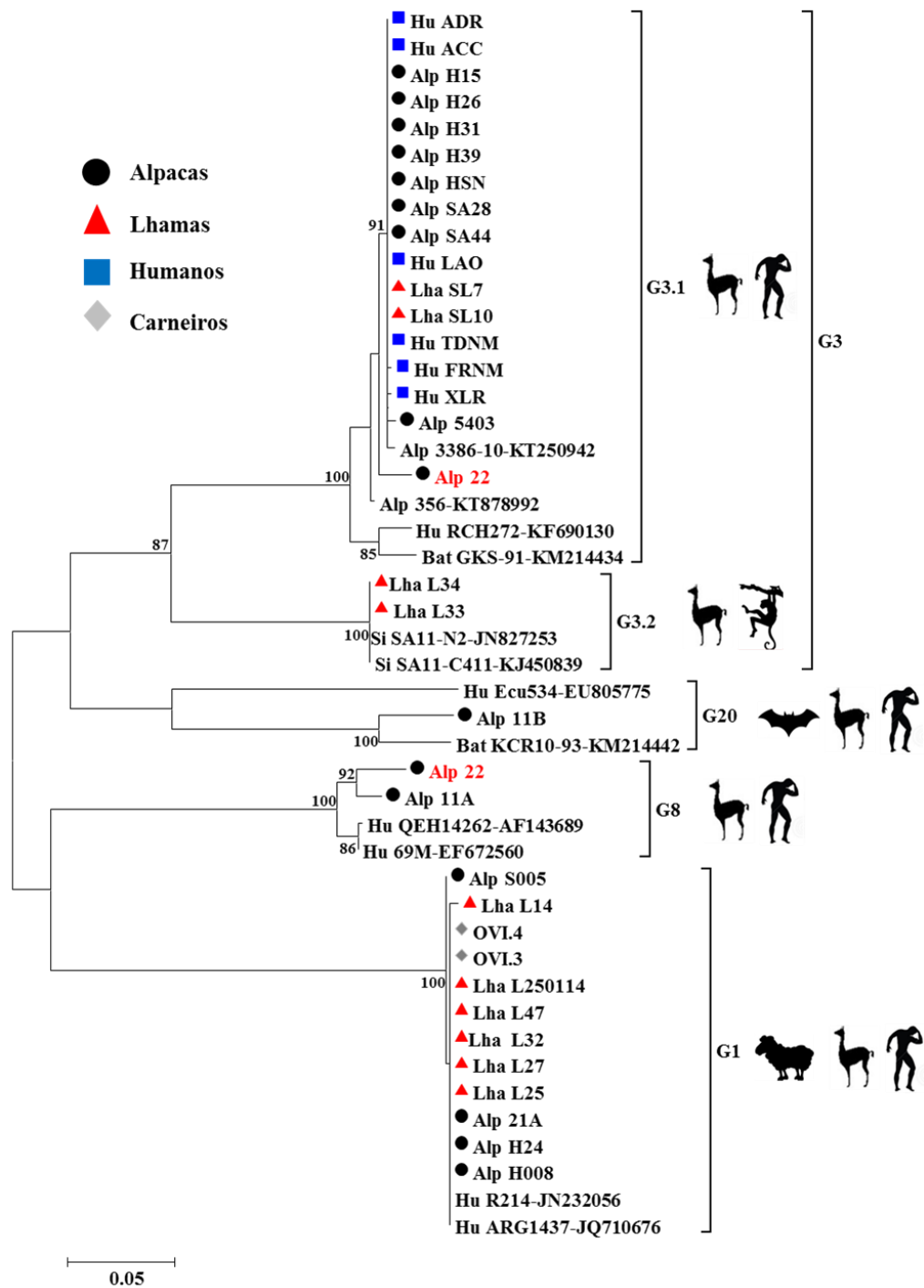
A análise filogenética das sequências das estirpes G1 (três de alpacas, seis de lhamas e duas de carneiros) revelou que estas apresentam de 99,8 a 100% de identidade nucleotídica com estirpes de RVA detectadas em humanos no Brasil (R245) e na Argentina (ARG1437), respectivamente.

A análise das estirpes do genótipo G3 revelou a circulação de duas linhagens. A maioria das estirpes foram classificadas na linhagem G3.1 (nove de alpacas, duas de lhamas e seis de humanos), as quais apresentam 97,9 a 100% de identidade nucleotídica dentre si. As estirpes da linhagem G3.1 são filogeneticamente próximas de outras estirpes de alpaca, detectadas na mesma região do estudo, 3368-10 e 356, de uma estirpe de morcego, GKS-912 (Gabão), e de uma estirpe de humanos, RCH272 (Austrália), com identidade nucleotídica de 99% e 98,6%, 95,8% e 95,3%, respectivamente. As estirpes da linhagem G3.2 foram detectadas em lhamas (L33 e L34), são idênticas entre si e apresentam 100% de identidade filogenética com as estirpes SA11-N2 (África do Sul) e SA11-C411 (Espanha), detectadas em símios e apresentam identidade de 82,7% com as estirpes da linhagem G3.1

O genótipo G8 foi identificado em duas estirpes de alpacas, Alp11A e Alp22, as quais possuem 97,1% de identidade nucleotídica entre si e são filogeneticamente próximas a estirpe humana 69M (Índia) com 97,1% e 96,4% de identidade nucleotídica, respectivamente.

Uma estirpe, Alp11B, foi identificada como G20. Contudo, de acordo com a análise da ferramenta RotaC<sup>2.0</sup>, esta estirpe apresenta apenas 79% de identidade nucleotídica com a estirpe de referência (Ecu534,) detectada em uma criança no Equador, ficando assim abaixo

do valor de corte para ser considerado o mesmo genótipo que é 80% de identidade nucleotídica. Por outro lado, a estirpe Alp11B apresentou 92,7% de identidade nucleotídica com uma estirpe de morcego, KCR10-93, detectada recentemente na Costa Rica, a qual possui 80% de identidade nucleotídica com a estirpe Ecu534. Desta forma, é possível que as estirpes Alp11B e KCR10-93 representem uma linhagem distinta dentro do genótipo G20.



**Figura 12.** Dendrograma construído a partir das sequências parciais da VP7 de estirpes de RVA.

As distâncias foram corrigidas usando o modelo de *Kimura 2-parameter*. O dendrograma foi construído pelo método de *Maximum Likelihood* e o apoio estatístico foi fornecido por *bootstrapping* de 1000 pseudoreplicatas. Valores de *bootstrap* acima de 75% são dados nos nós do ramo. A escala das distâncias está em substituições/sítio. A amostra Alp22 (vermelho) contém coinfeção de estirpes G3 e G8. As amostras de referência estão identificadas pelo número de acesso no *GenBank*.

### 5.2.1.2. Identificação dos genótipos P (VP4)

Foram obtidas sequências do gene que codifica a VP4 (VP8\*) de 12 estirpes detectadas em alpacas, 10 de lhamas, duas de carneiros e seis de humanos. Foram identificados os genótipos P[2] (lhama), P[6] (humano), P[8] (alpaca, lhama e carneiro), P[14] (alpaca), e um novo genótipo, P[40] (alpaca, lhama e humano). Duas amostras apresentaram coinfeção de duas estirpes pertencentes aos genótipos P8[8] e P[? - não identificado] (lhama) e P[40] e P[?] (alpaca) (**Figura 13**).

Uma estirpe de lhama, L250114, foi identificada como genótipo P[2] e apresenta, respectivamente, 99,9% e 100% de identidade nucleotídica com as estirpes símias SA11-C411 e SA11-N2.

Uma estirpe de humano, JCRQ, apresentou o genótipo P[6], com identidade nucleotídica de 99,3% e 99,8% com as estirpes de origem humana Se585 (Estados Unidos) e 5001DB97 (África do Sul), respectivamente.

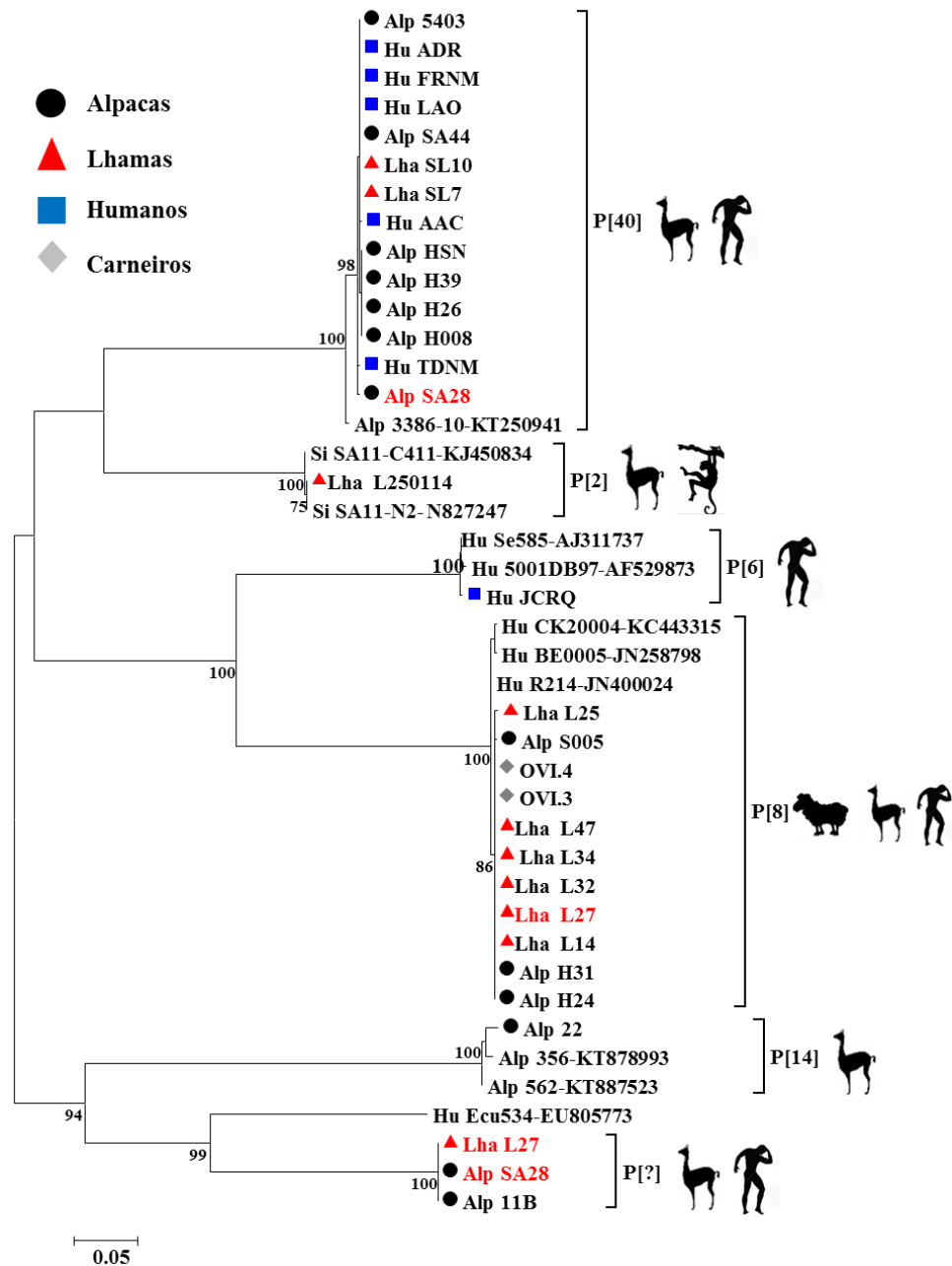
Onze estirpes (três de alpaca, seis de lhama e duas de carneiro) apresentaram o genótipo P[8]. Estas estirpes apresentam identidade nucleotídica de 99,8% a 100% entre si e são filogeneticamente próximas as estirpes de origem humana R214 (Brasil), BE0005 (Bélgica) e CK20004 (Austrália), com identidade nucleotídica de 99,8%, 99,3% e 99,3%, respectivamente.

Uma estirpe de alpaca, Alp22, apresentou o genótipo P[14] sendo filogeneticamente próxima a duas outras estirpes da mesma espécie, 356 (98,5% identidade nucleotídica) e 562 (98,7% identidade nucleotídica), recentemente descritas na mesma região do Peru.

Surpreendentemente, 14 estirpes (sete de alpacas, duas de lhamas e cinco de humanos) foram identificadas com pertencentes a um genótipo distinto, definido pelo RCWG como P[40]. Maiores detalhes sobre a identificação deste genótipo serão apresentados posteriormente. As estirpes P[40] apresentam entre 99,5% e 100% de identidade nucleotídica entre si e apresentaram 98,7% de identidade nucleotídica com a sequência de uma estirpe de alpaca, 3386-10, posteriormente identificada na mesma região de Cusco (Garmendia *et al.*, 2015).

A estirpe de alpaca, Alp11B, assim como para o genótipo G, apresentou uma sequência distinta. Esta sequência apresenta uma identidade nucleotídica máxima de 75,9% com a estirpe Ecu534 pertencente ao genótipo P[28], sendo este valor muito abaixo do valor

de corte para a identificação dos genótipos P (80%). A sequência foi enviada para avaliação pelo RCWG que sugeriu que possivelmente representa um novo genótipo P[?]. Contudo, é necessário o sequenciamento da ORF completa para que este dado seja confirmado. Sequências semelhantes, apresentando 98% a 100% de identidade nucleotídica, foram encontradas em duas estirpes que apresentaram coinfeção: SA28, de alpaca, P[40] e P[?] e L27, de lhama, P[8] e P[?].



**Figura 13.** Dendrograma construído a partir das sequências parciais da VP4 (VP8\*) de estirpes de RVA.

As distâncias foram corrigidas usando o modelo de *Kimura 2-parameter*. O dendrograma foi construído pelo método de *Maximum Likelihood* e o apoio estatístico foi fornecido por *bootstrapping* de 1000 pseudoreplicas. Valores de *bootstrap* acima de 75% são dados nos nós do ramo. A escala das distâncias está em substituições/sítio. As amostras SA28 e L27 (vermelho) contém coinfeções de estirpes P[40]/P[?] e P[8]/P[?], respectivamente. As amostras de referência estão identificadas pelo número de acesso no *GenBank*.

### 5.2.1.3. Identificação dos genótipos I (VP6)

Foram obtidas sequências do gene que codifica a VP6 de 15 estirpes detectadas em alpacas, sete de lhamas, uma de carneiros e cinco de humanos. Foram identificados os genótipos I1 (alpaca, lhama e humano), I2 (alpaca, lhama e carneiro), I8 (alpaca, lhama e humano) e I13 (alpaca) (**Figura 14**). Não foram identificadas coinfeccções.

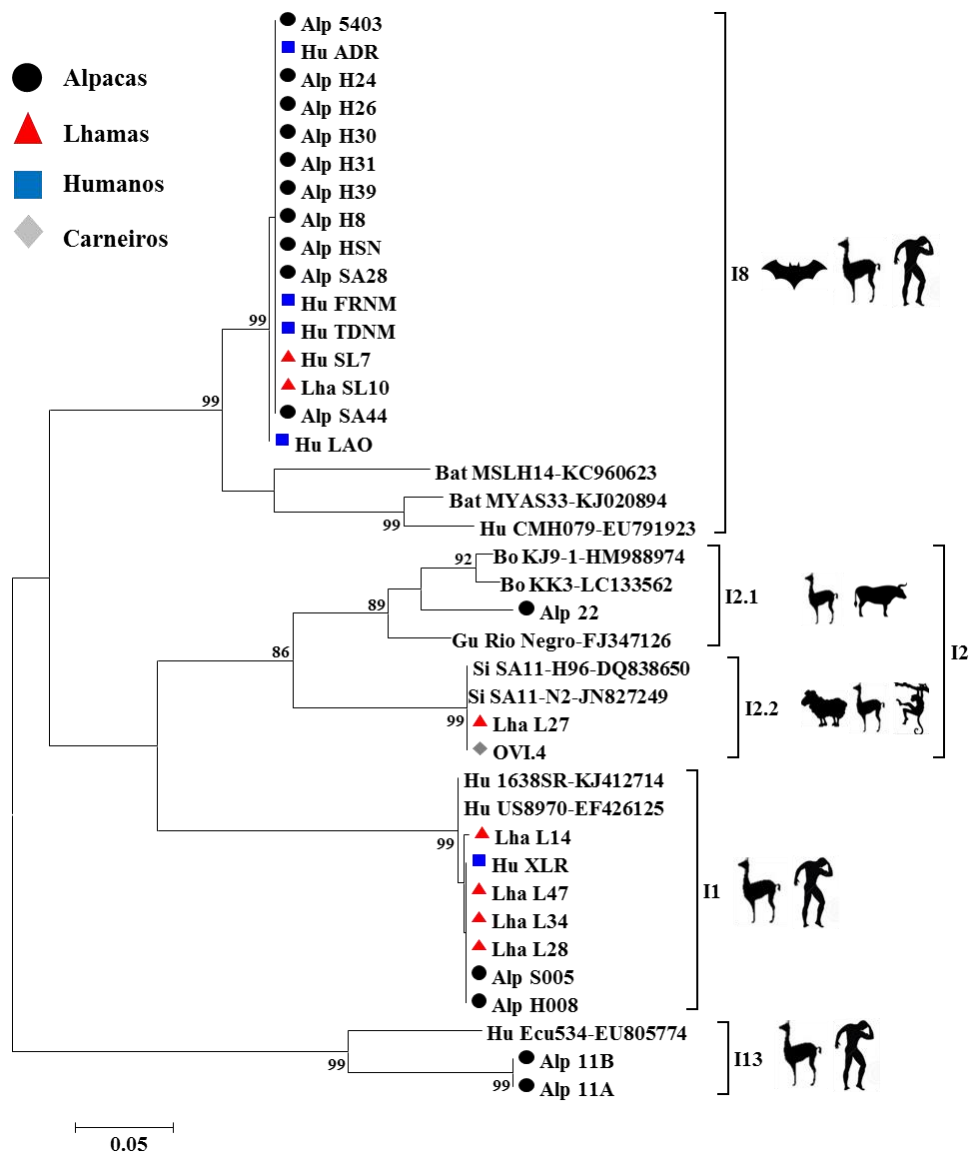
Sete estirpes (duas de alpacas, quatro de lhamas e uma de humano) pertenciam ao genótipo I1 e apresentaram identidade nucleotídica de 99,9% a 100% com estirpes de origem humana provenientes do Paraguai (1638SR) e dos Estados Unidos (US8970), respectivamente.

A análise filogenética das estirpes pertencentes ao genótipo I2 revelou a circulação de duas linhagens distintas. A linhagem I2.1, representada pela estirpe de alpaca Alp22, apresenta identidade nucleotídica de 93,8% com as estirpes de bovino, KJ9-1 (Coreia do Sul) e KK3 (Japão), e 93,5% com a estirpe de guanaco, Rio Negro (Argentina), respectivamente. A linhagem I2.2, formada pela estirpe de lhama L27 e de carneiro OVI.4, idênticas entre si, apresentam identidade nucleotídica de 85,9% com a estirpe de alpaca Alp22 e 100% com as estirpes símias SA11-N2 e SA11-H96 (África do Sul).

Foram identificadas 16 estirpes do genótipo I8 (10 de alpacas, duas de lhamas e quatro de humanos). Estas estirpes apresentaram 99,7% a 100% de identidade nucleotídica entre si e 89,7%, 87,3% e 85,5% com as estirpes MSLH14 e MYAS33 de morcego (China) e CM079 de humano (Tailândia), respectivamente.

Por último, duas estirpes de alpaca pertenciam ao genótipo I13 (Alp11A e Alp11B), as quais são idênticas entre si e apresentam 89% de identidade nucleotídica com a única estirpe pertencente a este genótipo descrita até o momento, Ecu534, isolada de humano.





**Figura 14.** Dendrograma construído a partir das sequências parciais da VP6 de estirpes de RVA.

As distâncias foram corrigidas usando o modelo de *Kimura 2-parameter*. O dendrograma foi construído pelo método de *Maximum Likelihood* e o apoio estatístico foi fornecido por *bootstrapping* de 1000 pseudoreplicatas. Valores de *bootstrap* acima de 75% são dados nos nós do ramo. A escala das distâncias está em substituições/sítio. As amostras de referência estão identificadas pelo número de acesso no *GenBank*.

#### 5.2.1.4. Identificação dos genótipos E (NSP4)

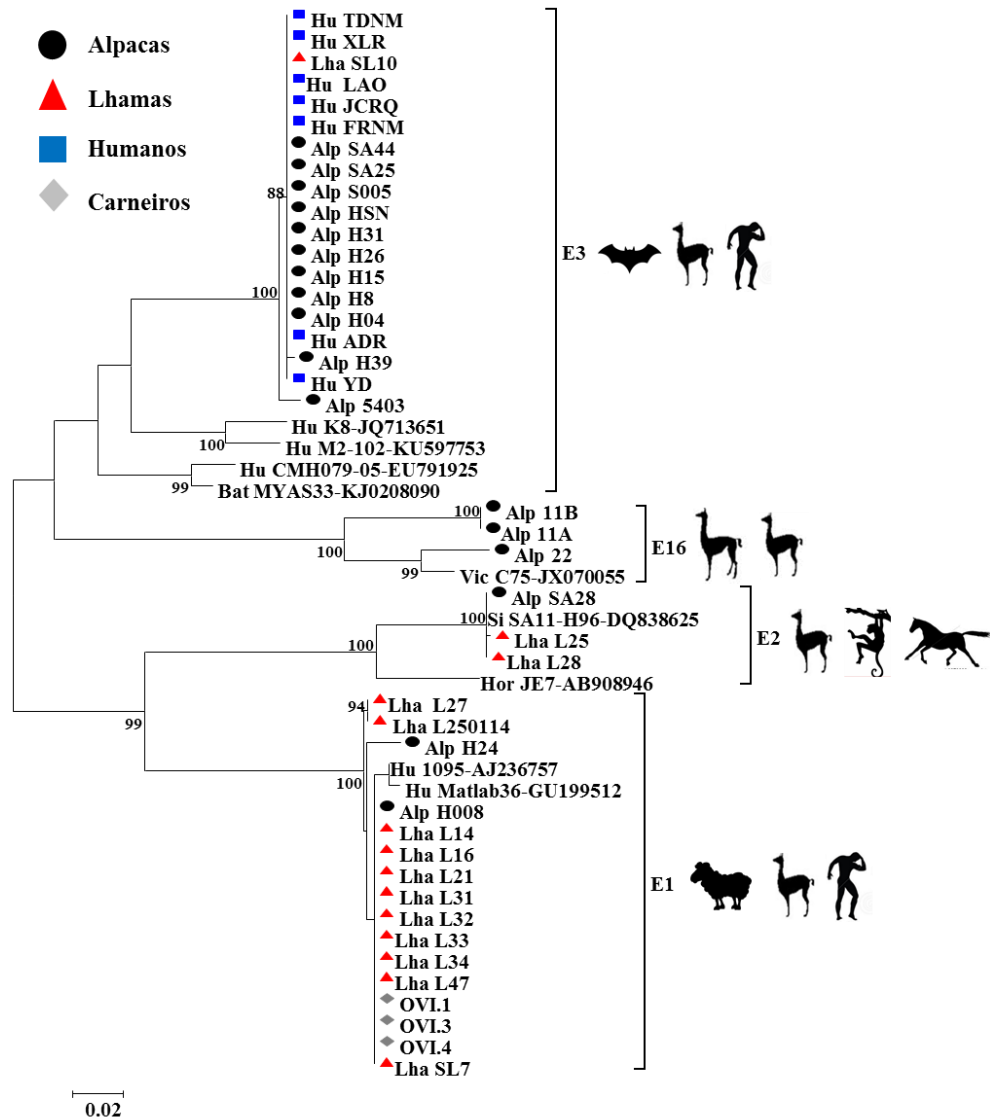
Foram obtidas sequências do gene que codifica a NSP4 de 17 estirpes detectadas em alpacas, 14 de lhamas, três de carneiros e sete de humanos. Foram identificados os genótipos E1 (alpaca, lhama e carneiro), E2 (alpaca e lhama), E3 (alpaca, lhama e humano) e E16 (alpaca) (**Figura 15**). Não foram identificadas coinfeções.

Dezesseis estirpes (duas de alpacas, 11 de lhamas e três de carneiros) foram identificadas como pertencentes ao genótipo E1. Estas estirpes apresentaram identidade nucleotídica de 99,4% a 100% entre si e 99,3% e 98,8% com estirpes as de humanos 1095 (Estados Unidos) e Maltab36 (Bangladesh), respectivamente.

As estirpes SA28 (alpaca), L25 e L28 (lhama) pertencem ao genótipo E2, as quais apresentam 100% de identidade nucleotídica entre si e com a estirpe símia SA11-H96.

Dezenove estirpes foram identificadas como E3 (11 de alpacas, uma de lhama, e sete de humanos). Elas apresentam 98,8% a 100% de identidade nucleotídica entre si e 90,3% com as estirpes de humanos M2-102 (China) e K8 (Japão) e com a estirpe de morcego MYAS33.

Três estirpes de alpaca (Alp11A, Alp11B e Alp22) foram identificadas como E16 com 90% a 100% de identidade nucleotídica entre si. A única estirpe do genótipo E16 descrita previamente, C75, detectada em vicunha na Argentina, apresentou 91,1% de identidade nucleotídica com as estirpes Alp11A e Alp11B e 96,1% com a estirpe Alp22.



**Figura 15.** Dendrograma construído a partir das sequências parciais da NSP4 de estirpes de RVA.

As distâncias foram corrigidas usando o modelo de *Kimura 2-parameter*. O dendrograma foi construído pelo método de *Maximum Likelihood* e o apoio estatístico foi fornecido por *bootstrapping* de 1000 pseudoreplicas. Valores de *bootstrap* acima de 75% são dados nos nós do ramo. A escala das distâncias está em substituições/sítio. As amostras de referência estão identificadas pelo número de acesso no *GenBank*.

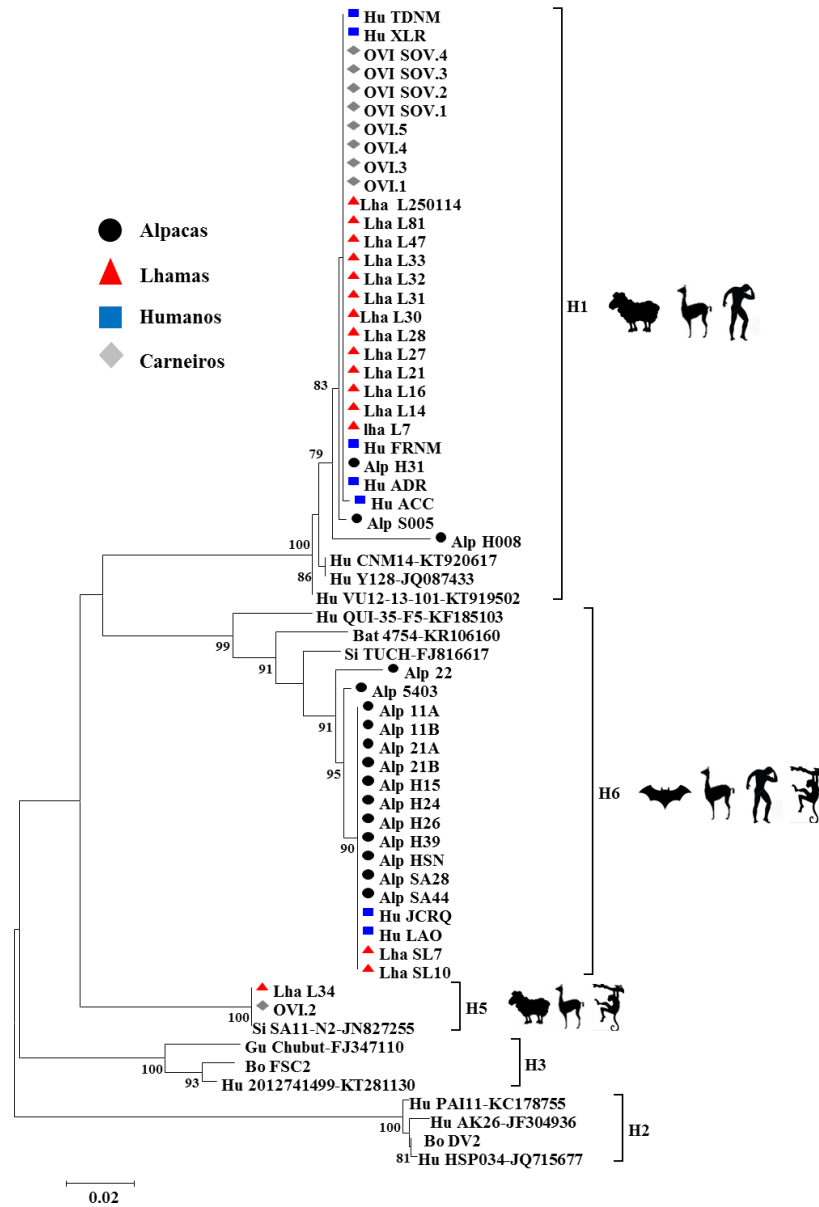
### 5.2.1.5. Identificação dos genótipos H (NSP5)

Foram obtidas sequências do gene que codifica a NSP5 de 17 estirpes detectadas em alpacas, 16 de lhamas, nove de carneiros e sete de humanos. Foram identificados os genótipos H1 (alpaca, lhama, carneiro e humano), H5 (lhama e carneiro) e H6 (alpaca, lhama, carneiro e humano) (**Figura 16**). Não foram identificadas coinfeções.

Vinte e duas estirpes (três de alpacas, 13 de lhamas, uma de carneiro e cinco de humanos) foram identificadas como H1. As quais apresentam identidade nucleotídica entre 97,2% e 100% dentre si e 99,3% com as estirpes de humanos CNMA e VU12-13-101 (Estados Unidos) e Y128 (China).

As estirpes H5 foram detectadas em lhama (L34) e carneiro (OVI.2) as quais são idênticas entre si e à estirpe símia SA11-N2.

O genótipo H6 foi identificado em 25 estirpes (14 de alpacas, duas de lhamas, sete de carneiros e duas de humanos). Estas estirpes apresentaram 99,5% a 100% de identidade nucleotídica entre si, 97,3% com a estirpe símia TUCH (Estados Unidos), 96,7% com a estirpe de morcego 4754 (Brasil) e 95,7% com a estirpe humana QUI-35-F5 (Brasil).



**Figura 16.** Dendrograma construído a partir das sequências parciais da NSP5 de estirpes de RVA.

As distâncias foram corrigidas usando o modelo de *Kimura 2-parameter*. O dendrograma foi construído pelo método de *Maximum Likelihood* e o apoio estatístico foi fornecido por *bootstrapping* de 1000 pseudoreplicatas. Valores de *bootstrap* acima de 75% são dados nos nós do ramo. A escala das distâncias está em substituições/sítio. As amostras de referência estão identificadas pelo número de acesso no *GenBank*.

### 5.2.2. Identificação dos genótipos G (VP7), P (VP4), I (VP6), E (NSP4) e H (NSP5) por *multiplex* RT-PCR

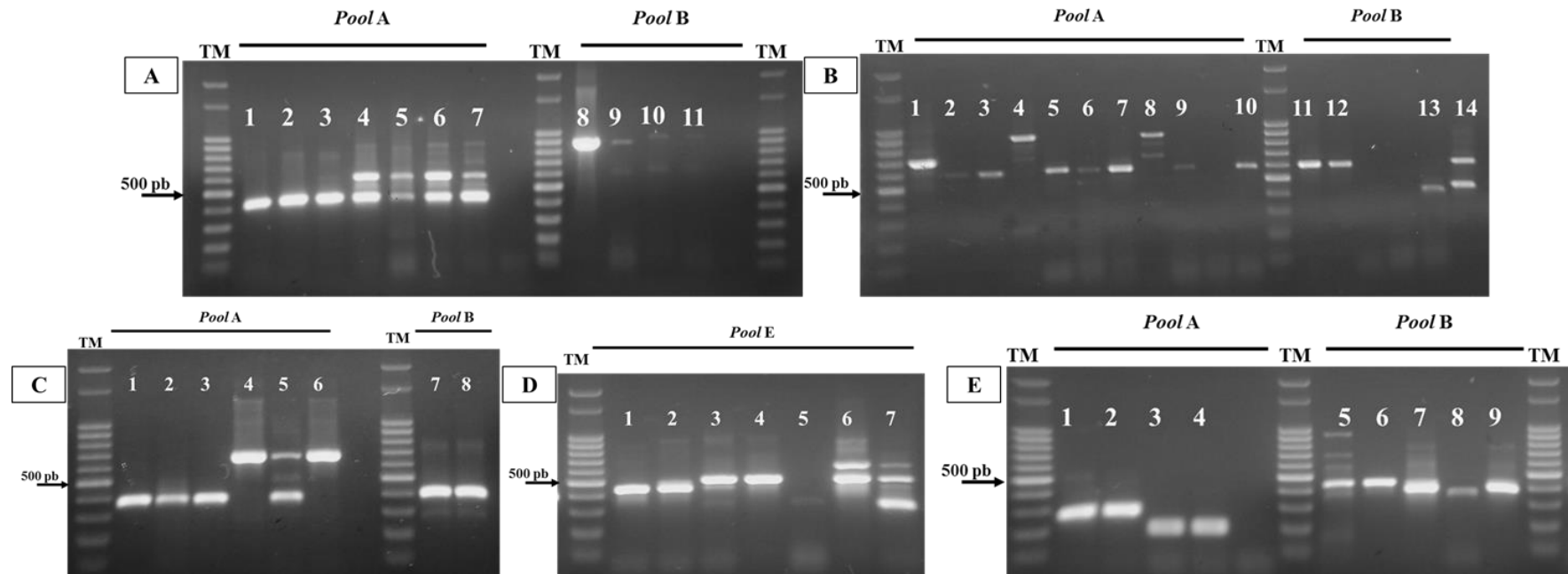
As sequências obtidas de diferentes genótipos codificados pelos genes VP7, VP4, VP6, NSP4 e NSP5 circulantes na região do estudo, foram utilizadas para a seleção de iniciadores capazes de identificar estes genótipos, para serem utilizados em reações de *multiplex* RT-PCR a fim de completar a identificação das estirpes. Foram também utilizadas sequências de referência para os diversos genótipos depositados no *GenBank*.

Inicialmente, foi realizada a padronização das reações de *multiplex* RT-PCR utilizando as estirpes de referência dos diversos genótipos disponíveis no LAVIREO identificadas por sequenciamento, para confirmar a especificidade dos iniciadores. Os resultados demonstraram a especificidade dos iniciadores selecionados. As reações foram realizadas individualmente, para cada gene, utilizando *pool* de iniciadores para os diversos genótipos: VP7: *pool* A (G1/G3/G8) e *pool* B (G20); VP4: *pool* A (P[1], P[14], P[40] e P[?]) e *pool* B (P[2], P[6] e P[8]); VP6: *pool* A (I1 e I2) e *pool* B (I8 e I13); NSP4: *pool* E (E1, E2, E3 e E16) e NSP5: *pool* A (H1, H2 e H6) e *pool* B (H3 e H5) (**Quadro S5**).

Foram selecionadas 39 amostras fecais positivas para serem reanalisadas utilizando esta metodologia. A escolha das amostras foi realizada com base nos seguintes critérios: (i) que a amostra tivesse, pelo menos, três genes identificados por sequenciamento; e/ou (ii) que apresentasse algum genótipo incomum e/ou (iii) que apresentasse uma combinação genotípica incomum. Com base nestes critérios foram selecionadas 16 amostras de alpaca, 11 de lhamas, quatro de carneiros e oito de humanos.

Os resultados foram inesperados e surpreendentes, uma vez que 33 (84,5%) das 39 amostras analisadas apresentaram coinfeções, demonstradas pela detecção de dois ou mais genótipos para algum dos genes analisados: alpacas 68,8% (11/16), lhamas 81,8% (9/11), carneiros 100% (4/4) e humanos 75% (6/8) (**Figura 17, Tabela 5**). Foram ainda detectadas estirpes contendo genótipos não identificados no sequenciamento como P[1] e H3. Os iniciadores para estes genótipos foram incluídos na análise porque havia sequências de camelídeos depositadas no *GenBank* com estas especificidades.

Na **Tabela 5** está apresentado o resumo dos genótipos das estirpes detectadas neste estudo, identificados por sequenciamento e *multiplex* RT-PCR. São mostradas apenas as estirpes para as quais, pelo menos, três genótipos foram identificados.



**Figura 17.** Genotipagem das estirpes de RVA por multiplex PCR.

**A** - Amplificação dos genótipos G (VP7). *Pool A*: linhas 1 – 3 amostras XLR, Alp11B e 5403 (G3); Linhas 4 – 7 amostras H008, 250114, S005 e L14 (G1+G3). *Pool B*: linhas 8 – 11 amostras Alp11, S005, OVI.3 e OVI.4 (G20). Tamanho esperado dos produtos amplificados para cada genótipo: G1 - 586 pb, G3 - 408 pb e G20 - 941 pb. **B** - Amplificação dos genótipos P (VP4). *Pool A*: linhas 1, 4 e 8 amostras Alp11, 250114 e L47 (P[?]+P[14]); linhas 2, 3, 5 – 7, 9 e 10 amostras H39, XLR, H26, HSN, SL10, H008 e ADR (P[40]). *Pool B*: linhas 11 e 12 amostras L47 e OVI.4 (P[8]); Linha 13 amostra XLR (P[2]) e Linha 14 amostra 250114 (P[2]+P[8]). Tamanho esperado dos produtos amplificados para cada genótipo: P[2] – 420 pb, P[8] – 599 pb, P[1] – 815 pb, P[40] – 587 pb e P[?] – 701 pb. **C** - Amplificação dos genótipos I (VP6). *Pool A*: Linhas 1 – 3 amostras L14, L34 e S005 (I1); linhas 4 e 6 amostras Alp22 e OVI.4 (I2) e linha 5 amostra L27 (I1+I2). *Pool B*: linhas 7 e 8 amostras 5403 e SA44 (I8). Tamanho esperado dos produtos amplificados para cada genótipo: I1 – 381 pb, I2 – 682 pb e I8 – 404 pb. **D** - Amplificação dos genótipos E (NSP4). *Pool E*: linhas 1 e 2 amostras Alp11B e Alp22 (E16); linhas 3 e 4 amostras H008 e L14 (E1); linha 5 amostra AAC (E3); linha 6 amostra H24 (E1+E2) e linha 6 amostra H39 (E1+E2+E3). Tamanho esperado dos produtos amplificados para cada genótipo: E1 – 505 pb, E2 – 643 pb, E3 – 312 pb e E16 – 440 pb. **E** - Amplificação dos genótipos H (NSP5). *Pool A*: linhas 1 e 2 amostras Alp22 e H39 (H6); linhas 3 e 4 amostras AAC e H008 (H1); linhas 5 e 6 amostras Alp22 e AAC (H3) e linhas 7 – 9 amostras H008, Alp21A e L25 (H5). Tamanho esperado dos produtos amplificados para cada genótipo: H1 – 191 pb, H3 – 436 pb, H5 – 387 pb e H6 – 272 pb. TM = marcador de tamanho molecular 100 pb (Ludwig Biotec); o fragmento de maior intensidade corresponde a 500 pb.

**Tabela 5.** Genótipos G, P, I, E e H identificados nas estirpes de RVA detectadas no estudo.

Estirpe	Sítio de coleta <sup>1</sup>	Genótipo				
		G	P	I	E	H
RVA/Alpaca-wt/PER/Alp11A/2010	Silli	<b>G8</b>	<b>P[x]<sup>3</sup></b>	<b>I13</b>	<b>E16</b>	<b>H6</b>
RVA/Alpaca-wt/PER/Alp11B/2010	Silli	<b>G3/G20</b>	<b>P[2]/P[8]/P[14]/P[?]<sup>4</sup></b>	<b>I13</b>	<b>E16</b>	<b>H3/H6</b>
RVA/Alpaca-wt/PER/Alp21A/2010	Silli	<b>G1</b>	<b>P[x]</b>	<b>Ix</b>	E2/E16	H5/H6
RVA/Alpaca-wt/PER/Alp22/2010	Silli	<b>G3/G8</b>	<b>P[2]/P[14]/P[40]/P[?]</b>	<b>I2</b>	<b>E16</b>	<b>H3/H6</b>
RVA/Alpaca-wt/PER/Alp5403/2010	Silli	<b>G3</b>	<b>P[40]</b>	<b>I8</b>	E1/ E2/ <b>E3</b>	<b>H5/H6</b>
RVA/Alpaca-wt/PER/H008/2012	IVITA	<b>G1/G3</b>	<b>P[40]</b>	<b>I1/I8</b>	<b>E1</b>	<b>H1/H5</b>
RVA/Alpaca-wt/PER/S005/2012	IVITA	<b>G1/G3/G20</b>	<b>P[2]/P[8]/P[40]/P[?]</b>	<b>I1</b>	E1/E2/ <b>E3</b>	<b>H1/H5/H6</b>
RVA/Alpaca-wt/PER/H15/2014	IVITA	<b>G3</b>	<b>P[x]</b>	<b>Ix</b>	<b>E3</b>	<b>H6</b>
RVA/Alpaca-wt/PER/H24/2014	IVITA	<b>G1</b>	<b>P[2]/P[8]/P[40]</b>	<b>I1/I2/I8</b>	<b>E1/E2</b>	<b>H6</b>
RVA/Alpaca-wt/PER/H26/2014	IVITA	<b>G1/G3</b>	<b>P[1]/P[40]</b>	<b>I1/I8</b>	E1/E2/ <b>E3</b>	<b>H6</b>
RVA/Alpaca-wt/PER/H31/2014	IVITA	<b>G3</b>	<b>P[2]/P[8]</b>	<b>I8</b>	<b>E3</b>	<b>H1/H6</b>
RVA/Alpaca-wt/PER/H39/2014	IVITA	<b>G3</b>	<b>P[40]</b>	<b>I8</b>	E1/E2/ <b>E3</b>	<b>H6</b>
RVA/Alpaca-wt/PER/HSN/2014	IVITA	<b>G3</b>	<b>P[40]</b>	<b>I1/I8</b>	E1/E2/ <b>E3</b>	<b>H6</b>
RVA/Alpaca-wt/PER/SA25/2014	Silli	Gx	<b>P[x]</b>	<b>I1/I8</b>	<b>E3</b>	H6
RVA/Alpaca-wt/PER/SA28/2014	Silli	<b>G3</b>	<b>P[2]/P[8]/P[40]/P[?]</b>	<b>I8</b>	<b>E2</b>	<b>H1/H3/H6</b>
RVA/Alpaca-tc/PER/SA44/2014	Silli	<b>G3</b>	<b>P[40]</b>	<b>I8</b>	<b>E3</b>	<b>H6</b>
RVA/Lhama-wt/PER/L14/2014	IVITA	<b>G1/G3/G8</b>	<b>P[8]/P[40]</b>	<b>I1</b>	<b>E1</b>	<b>H1</b>
RVA/Lhama-wt/PER/L25/2014	IVITA	<b>G1</b>	<b>P[8]/P[40]</b>	<b>Ix</b>	<b>E2/E3</b>	H1/H5
RVA/Lhama-wt/PER/L27/2014	IVITA	<b>G1</b>	<b>P[8]/P[?]</b>	<b>I1/I2/I13</b>	<b>E1</b>	<b>H1</b>
RVA/Lhama-wt/PER/L28/2014	IVITA	Gx	<b>P[x]</b>	<b>I1</b>	<b>E2</b>	<b>H1</b>
RVA/Lhama-wt/PER/L32/2014	IVITA	<b>G1</b>	<b>P[2]/P[8]</b>	<b>Ix</b>	<b>E1</b>	<b>H1</b>
RVA/Lhama-wt/PER/L33/2014	IVITA	<b>G3</b>	<b>P[8]/P[40]</b>	<b>I1</b>	<b>E1</b>	<b>H1</b>
RVA/Lhama-wt/PER/L34/2014	IVITA	<b>G3</b>	<b>P[8]</b>	<b>I1/I8</b>	<b>E1</b>	<b>H5</b>
RVA/Lhama-wt/PER/L47/2014	IVITA	<b>G1</b>	<b>P[8]/P[14]/P[?]</b>	<b>I1</b>	<b>E1</b>	<b>H1</b>
RVA/Lhama-wt/PER/250114/2014	IVITA	<b>G1/G3</b>	<b>P[2]/P[8]/P[14]/P[?]</b>	<b>Ix</b>	<b>E1</b>	<b>H1/H3</b>
RVA/Lhama-wt/PER/SL7/2014	Silli	<b>G3</b>	<b>P[1]/P[6]/P[40]</b>	<b>I8</b>	<b>E1</b>	<b>H6</b>
RVA/Lhama-wt/PER/SL10/2014	Silli	<b>G3</b>	<b>P[1]/P[40]</b>	<b>I8</b>	<b>E3</b>	<b>H6</b>
RVA/Carneiro-wt/PER/OVI.3/2014	IVITA	<b>G1/G3/G20</b>	<b>P[8]/P[14]/P[?]</b>	<b>Ix</b>	<b>E1</b>	<b>H1/H3</b>



RVA/Carneiro-wt/PER/OVI.4/2014	IVITA	<b>G1/G3/G20</b>	<b>P[8]</b>	<b>I2</b>	<b>E1</b>	<b>H1</b>
RVA/Carneiro-wt/PER/SOV.1/2014	Silli	Gx	P[1]/P[40]	I1	Ex	<b>H1</b>
RVA/Carneiro-wt/PER/SOV.2/2014	Silli	Gx	P[1]/P[40]	I1	E1	<b>H1</b>
RVA/Humano-wt/PER/LAO/2010	Silli	<b>G3</b>	<b>P[40]</b>	<b>I8</b>	<b>E3</b>	<b>H6</b>
RVA/Humano-wt/PER/ADR/2010	Silli	<b>G3</b>	<b>P[40]</b>	<b>I8</b>	<b>E3</b>	<b>H1</b>
RVA/Humano-wt/PER/XLR/2010	Silli	<b>G3</b>	P[2]/P[40]	<b>I1/I13</b>	<b>E3</b>	<b>H1</b>
RVA/Humano-wt/PER/YD/2010	Silli	Gx	P[x]	I1	<b>E3</b>	H1/H3
RVA/Humano-wt/PER/FRNM/2014	Silli	<b>G3</b>	P[8]/P[14]/ <b>P[40]</b> /P[?]	I1/ <b>I8</b>	<b>E3</b>	<b>H1</b>
RVA/Humano-wt/PER/TDNM/2014	Silli	<b>G3</b>	<b>P[40]</b>	I1/ <b>I8</b>	E1/E2/ <b>E3</b>	<b>H1</b>
RVA/Humano-wt/PER/AAC/2014	IVITA	<b>G3</b>	<b>P[40]</b>	Ix	E3	<b>H1/H3</b>
RVA/Humano-wt/PER/JCRQ/2014	IVITA	G3	<b>P[6]</b> /P[40]/P[?]	Ix	<b>E3</b>	H1/H3/ <b>H6</b>

Os genótipos em **negrito** foram identificados por sequenciamento.<sup>1</sup> Silli = Comunidade camponesa de Silli; Instituto Veterinário de Investigaciones Tropicales y de Altura. \* P[?] = genótipo não identificado. <sup>3</sup> A letra **x** indica que não foi possível a identificação do genótipo. <sup>4</sup> P[?] = genótipo não identificado.

### 5.3. Avaliação da incidência dos diferentes genótipos identificados entre as espécies estudadas

Para esta avaliação os genótipos presentes em coinfeções foram somados individualmente. No geral, entre as diferentes espécies estudadas, foram genotipadas 52 estirpes para o genótipo G (VP7). O genótipo G3 foi detectado em maior frequência, 52% (27/52), seguido de G1 (25%, 13/52), G20 (7,7%, 4/52) e G8 (5,8%, 3/52); o genótipo de uma estirpe não foi identificado (**Tabela 5**).

Para a VP4 (P) foram genotipadas 78 estirpes sendo identificados seis diferentes genótipos: P[40] (30,8%, 24/78), P[8] (20,5%; 16/78), P[?; possível novo genótipo] (12,8%, 10/78), P[2] (11,5%, 9/78), P[14] (7,7%, 6/78), P[1] (6,4%, 5/78), P[6] (2,6%, 2/78); o genótipo de seis estirpes não foi identificado (**Tabela 5**).

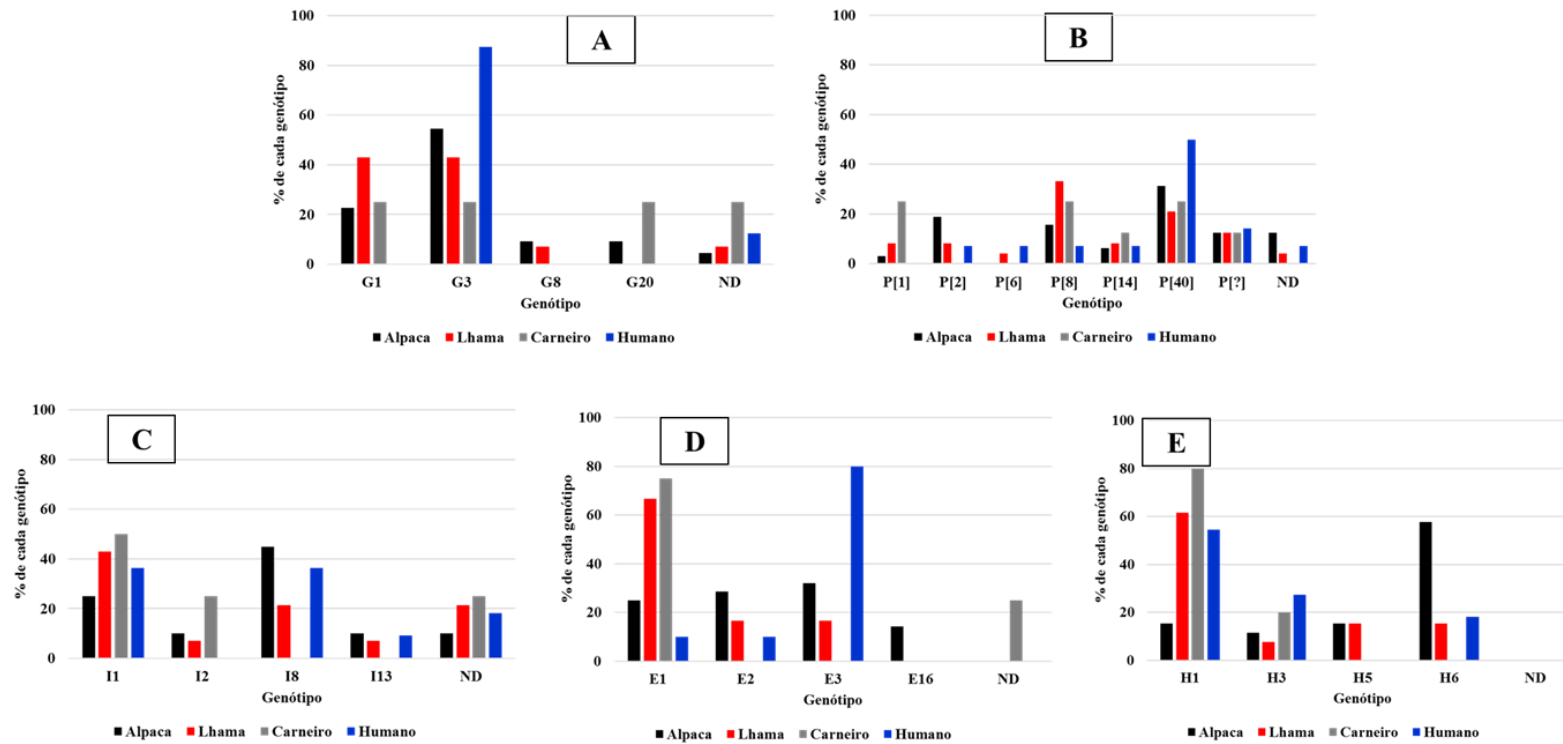
Para VP6 (I) foram genotipadas 49 estirpes sendo identificados quatro genótipos: I1 (34,7%, 17/49), I8 (32,7%, 16/49), I2 (8,2%, 4/49) e I13 (8,2%, 4/49); o genótipo de oito estirpes não foi identificado (**Tabela 5**).

Para NSP4 (E) foram genotipadas 54 estirpes sendo identificados quatro genótipos: E1 (35,2%, 19/54), E3 (35,2%, 19/54), E2 (20,4%, 11/54), e E16 (7,4%, 4/54); o genótipo de uma estirpe não foi identificado (**Tabela 5**).

Finalmente, para NSP5 foram genotipadas 56 estirpes sendo identificados quatro diferentes genótipos: H1 (41,1%, 23/56), H6 (33,9%, 19/56), H3 (14,3%, 8/56) e H5 (10,7%, 6/56) (**Tabela 5**).

A distribuição dos genótipos individualmente por espécie hospedeira está mostrada na **Figura 18**. Entre as alpacas os genótipos mais frequentes foram G3 (54,6%), P[40] (31,2%), I8 (45%), E3 (32,1%) e H6 (57,7%). Entre lhamas os genótipos mais frequentes foram G1 (42,9%) e G3 (42,9%), P[8] (33,3%), I1 (43%), E1 (66,6%) e H1 (61,5%). Entre carneiros os genótipos mais frequentes foram G1 (25%), G3 (25%) e G20 (25%), P[1] (25%) e P[8] (25%), I1 (50%), E1 (75%) e H1 (80%). E entre humanos os genótipos mais frequentes foram G3 (87,5%), P[40] (50%), I1 (36,4%) e I8 (36,4%), E3 (80%) e H1 (54,5%).

Com base nesses dados poderíamos sugerir que as estirpes de RVA circulando no departamento de Cusco, Peru, possivelmente apresentam as seguintes constelações genômicas majoritárias: alpaca – G3-P[40]-I8-E3-H6; lhamas - G1/G3-P[8]-I1-E1-H1; carneiros - G1/G3/2G0-P[1]/P[8]-I1-E1-H1 e humanos – G3-P[40]-I1/I8-E3-H1.



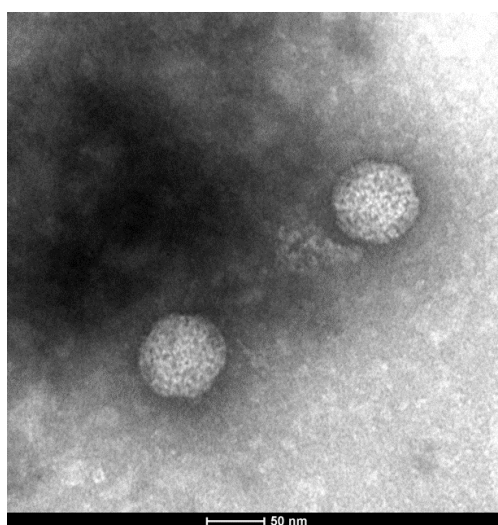
**Figura 18.** Distribuição dos diferentes genótipos G, P, I, E e H das estirpes de RVA, por espécie estudada.

A, B, C, D e E = distribuição dos genótipos G (VP7), P (VP4), I, (VP6), E (NSP4) e H (NSP5), respectivamente.

Os genótipos G3, P[40], I1, E1 e H1 foram detectados em todas as espécies estudadas em frequência elevada. Para 9,6%, 7,7%, 16,3%, 1,9% e 0% das estirpes não foram identificados os genótipos G, P, I, E e H, respectivamente.

### 5.3. Isolamento, em cultura de células, de estirpes contendo possíveis novos genótipos e sequenciamento do genoma completo destas estirpes

Os resultados da genotipagem indicavam a circulação de, pelo menos, dois novos genótipos P (VP4) entre diferentes espécies do departamento de Cusco. Com a finalidade de realizar a identificação destes novos genótipos, as amostras de alpaca Alp11B e SA44 foram inoculadas em cultura de células MA-104 para obtenção de massa viral. A amostra SA44 foi isolada em cultura de células com sucesso, como foi demonstrado por microscopia eletrônica (**Figura 19**).



**Figura 19.** Micrografia eletrônica da estirpe RVA/Alpaca-tc/PER/SA44/2014/G3P[40].

Sobrenadante da 3ª passagem da amostra SA44 em cultura de células MA-104 corado com ácido fosfotúngstico a 2% e examinados por microscopia eletrônica de transmissão.

Foi realizada a extração do RNAf.d. viral a partir do sobrenadante da 3ª passagem da amostra SA44 em cultura de células e foi realizada a amplificação e sequenciamento dos 11 segmentos genômicos da estirpe viral. As sequências obtidas foram enviadas para o RCWG para identificação dos genótipos e depositadas no *GenBank* sob os números de acesso KT935476-KT935485 e KU168341.

A comparação da sequência da estirpe SA44 com sequências de estirpes de referência de RVA sugeriu que a composição genômica desta estirpe possuía uma combinação de genes de diferentes origens (**Tabela 6, Figura 20**).

Os genes que codificam VP1, VP2, NSP1 e NSP2 mostraram uma identidade de nucleotídeos maior com estirpes RVA de origem humana RVA/Human-

wt/AUS/RCH272/2012/G3P[14], RVA/Human-wt/US/2012841174/2012/G8P[14], e RVA/Human-wt/US/09US7118/2009/G14P[24]. Os genes VP3 e NSP5 foram mais estreitamente relacionados com a estirpe símia RVA/Rhesus-tc/EUA/TUCH/2002/G3P[24]. Os genes VP6 e NSP4 apresentaram identidade de nucleotídeos elevada com estirpes RVA de morcego RVA/Bat-tc/CHN/MSLH14/2012/G3P[3] e RVA/Bat-tc/CHN/MYAS33/2013/G3P[10]. O gene da VP7 estava intimamente relacionado com a estirpe de camelídeos peruano RVA/Alpaca-tc/Per/K'ayra/3368-10/G3P[11] (99% de identidade de nucleotídeos e 99,7% identidade de aminoácido) e de RVA de humano, estirpe RVA/Human-wt/AUS/RCH272/2012/G3P[14] (95% de identidade de nucleotídeos e 99% de identidade de aminoácido). O gene da NSP3 foi mais relacionado com a estirpe equina RVA/Horse-wt/ARG/E3198/2008/G3P[3].

A sequência de nucleotídeos do 4<sup>a</sup> segmento genômico, que codifica o gene da VP4, não era relacionado a qualquer tipo RVA disponível no *GenBank* (**Tabela 6, Figura 21**). A maior identidade observada (75,7%) foi com a estirpe RVA/Simian-tc/USA/RRV/1975/G3P[3], porém a estava abaixo do valor de corte de 80% proposto pelo RCWG (Matthijnssens *et al.*, 2011). A sequência de nucleotídeos foi enviada ao RCWG para análise sendo atribuído o novo genótipo P[40]. A constelação genômica da estirpe SA44 foi G3-P[40]-I8-R3-C3-M3-A9-N3-T3-E3-H6, que difere completamente das outras constelações anteriormente relatadas para estirpes de RVA de camelídeos ou qualquer outra espécie da ordem *Artiodactyla* (**Tabela 7**).

Antes do isolamento em cultura de células tínhamos apenas o sequenciamento de aproximadamente 700pb correspondentes a porção VP8\*. Após o isolamento, nós sequenciamos o gene completo somente da 3<sup>a</sup> passagem. Isto porque nas 1<sup>a</sup> e 2<sup>a</sup> passagens a quantidade de vírus era baixa (determinada pela intensidade da banda da PCR). Contudo, comparamos a sequência obtida antes e depois do isolamento em cultura de células e eram idênticas.

**Tabela 6.** Porcentagem de identidade de nucleotídeos e aminoácidos dos segmentos do genoma completo da estirpe RVA/Alpaca-tc/PER/SA44/2014/G3P [40] comparado a sequência do gene cognato das estirpes mais próximas filogeneticamente presentes da base de dados do *GenBank*.

Gene	Valor de corte % <sup>†</sup>	Estirpe de referência	Nucleotídeo %	Aminoácido %	Genótipo	Nº de acesso
VP1	83	RVA/Human-wt/US/2012841174/2012/G8P[14]	92.9	98.0	R3	KJ411432
VP2	84	RVA/Human-wt/AUS/RCH272/2012/G3P[14]	88.9	97.8	C3	KF690126
VP3	81	RVA/Rhesus-tc/USA/TUCH/2002/G3P[24]	87.5	94.1	M3	EF583012
VP4	80	RVA/Simian-tc/USA/RRV/1975/G3P[3]	75.7	88.5	P[40] <sup>§</sup>	EU636927
VP6	85	RVA/Bat-tc/CHN/MSLH14/2012/G3P[3]	89.2	99.2	I8	KC960623
VP7	80	RVA/Alpaca-tc/Per/K'ayra/3368-10/2011 /G3P[11]	99.0	99.7	G3	KT250942
NSP1	79	RVA/Human-wt/AUS/RCH272/2012/G3P[14]	86.4	89.1	A9	KF690131
NSP2	85	RVA/Human-wt/US/09US7118/2009/G14P[24]	89.3	98.6	N3	KF541288
NSP3	85	RVA/Horse-wt/ARG/E403/2006/G14P[12]	94.8	96.1	T3	JF712585
NSP4	85	RVA/Bat-tc/CHN/MYAS33/2013/G3P[10]	90.3	95.4	E3	KJ020890
NSP5	91	RVA/Rhesus-tc/USA/TUCH/2002/G3P[24]	97.3	98.5	H6	FJ816617

<sup>†</sup> Valores de corte percentual de nucleotídeo definidos pelo RCWG (Matthijnssens *et al.*, 2011). <sup>§</sup> Novo genótipo VP4 determinado pelo RCWG.

**Tabela 7.** Constelação genômica da estirpe RVA/Alpaca-tc/PER/SA44/2014/G3P[40] comparada com estirpes de referência e de outros camelídeos.

Estirpe	Genótipo										
	VP7	VP4	VP6	VP1	VP2	VP3	NSP1	NSP2	NSP3	NSP4	NSP5
<b>RVA/Alpaca-tc/PER/SA44/2014/G3P[40]</b>	<b>G3</b>	<b>P[40]</b>	<b>I8</b>	<b>R3</b>	<b>C3</b>	<b>M3</b>	<b>A9</b>	<b>N3</b>	<b>T3</b>	<b>E3</b>	<b>H6</b>
RVA/Bat-tc/CHN/MSLH14/2012/G3P[3]	G3	P[3]	I8	R3	C3	M3	A9	N3	T3	E3	H6
RVA/Bat-tc/CHN/MYAS33/2013/G3P[10]	G3	P[10]	I8	R3	C3	M3	A9	N3	T3	E3	H6
RVA/Human-wt/THA/CMH079/05 /2005/G3P[10]	G3	P[10]	I8							E3	H6
RVA/Human-wt/THA/CMH222/2001/G3P[3]	G3	P[3]	I8							E3	
RVA/Horse-wt/ARG/E3198/2008/G3P[3]	G3	P[3]	I3	R3	C3	M3	A9	N3	T3	E3	H6
RVA/Human-tc/JPN/AU-1/1982/G3P[9]	G3	P[9]	I3	R3	C3	M3	A3	N3	T3	E3	H3
RVA/Dog-tc/ITA/RV198-95/1995/G3P[3]	G3	P[3]	I3	R3	C2	M3	A9	N2	T3	E3	H6
RVA/Dog-tc/USA/A79-10/1979/G3P[3]	G3	P[3]	I3	R3	C2	M3	A9	N2	T3	E3	H6
RVA/Dog-tc/AUS/K9-10/1981/G3P[3]	G3	P[3]	I3	R3	C2	M3	A9	N2	T3	E3	H6
RVA/Alpaca-tc/Per/K'ayra/3368-10/2011 /G3P[11]	G3	P[11]									
RVA/Human-wt/AUS/RCH272/2012/G3P[14]	G3	P[14]	I2	R3	C3	M3	A9	N2	T6	E2	H3
RVA/Rhesus-tc/USA/TUCH/2002/G3P[24]	G3	P[24]	I9	R3	C3	M3	A9	N1	T3	E3	H6
RVA/Simian-tc/USA/RRV/1975/G3P[3]	G3	P[3]	I2	R2	C3	M3	A9	N2	T3	E3	H6
RVA/Human-wt/US/2012841174/2012/G8P[14]	G8	P[14]	I2	R3	C2	M2	A3	N2	T6	E2	H3
RVA/Guanaco-wt/ARG/RíoNegro/1998/G8P[1]	G8	P[1]	I2	R5	C2	M2	A11	N2	T6	E12	H3
RVA/Guanaco-wt/ARG/Chubut/1999/G8P[14]	G8	P[14]	I2	R5	C2	M2	A3	N2	T6	E12	H3

RVA/Vicuña-wt/ARG/C75/2010/G8P[14]	G8	P[14]	I2	R2	C2	M2		N2	T6	E16	
RVA/Camel-wt/SDN/MRC-PRU47/2002/G8P[11]	G8	P[11]	I2	R2	C2	M2	A18	N2	T6	E2	H3
RVA/Camel-wt/KUW/s21/2010/G10P[15]	G10	P[15]	I1	R1	C2			N2	T2	E15	H3
RVA/Camel-wt/ /CRV/VRLCU/Egypt1/2004/G10	G10										
RVA/Horse-wt/ARG/E403/2006/G14P[12]	G14	P[12]	I2	R2	C2	M3	A10	N2	T3	E12	H7
RVA/Human-wt/US/09US7118/2009/G14P[24]	G14	P[24]	I9	R2	C3	M3	A9	N3	T3	E3	H6

As áreas em cor cinza indicam sequências de genes cognatos com identidade nucleotídica mais elevada.



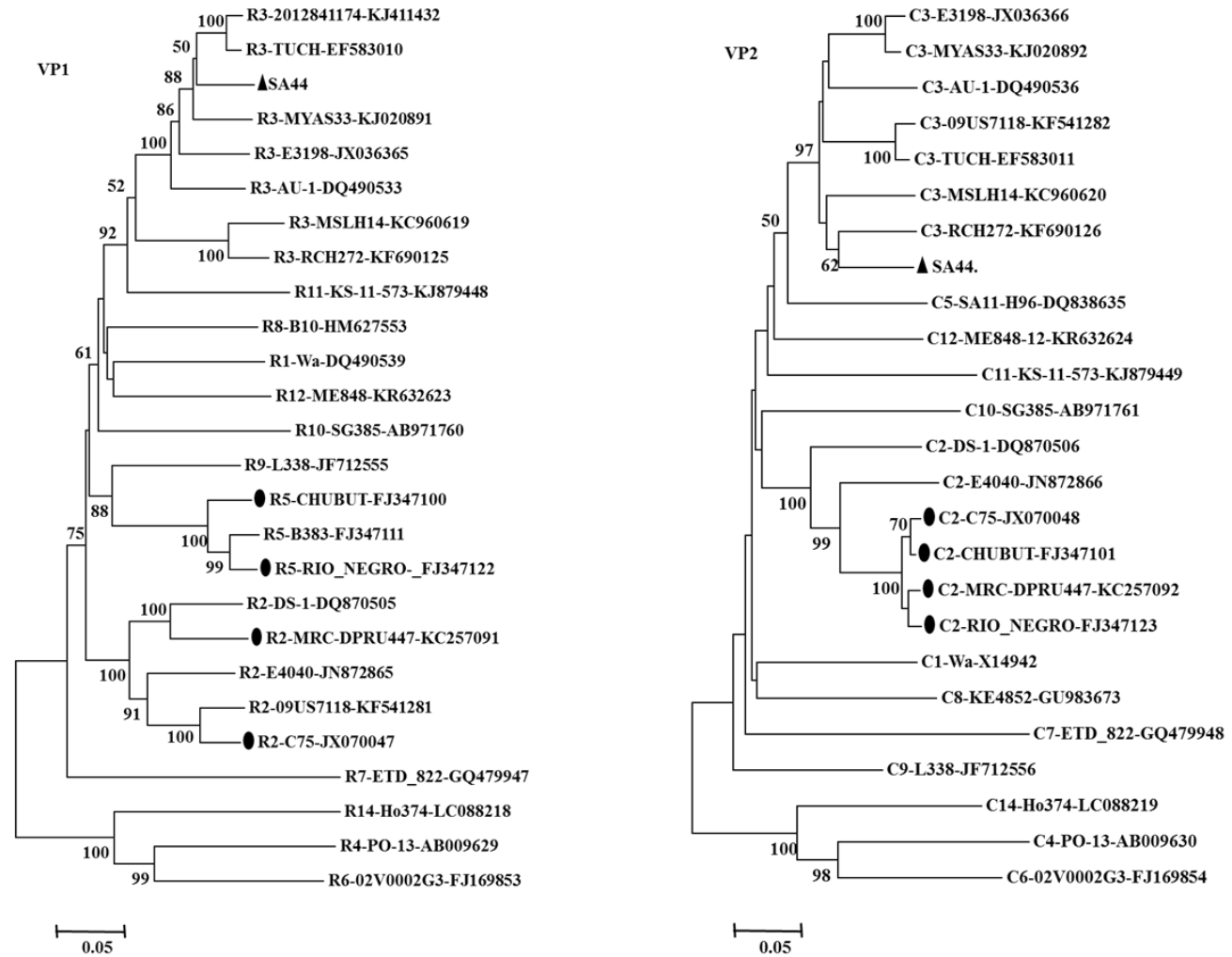


Figura 20-1

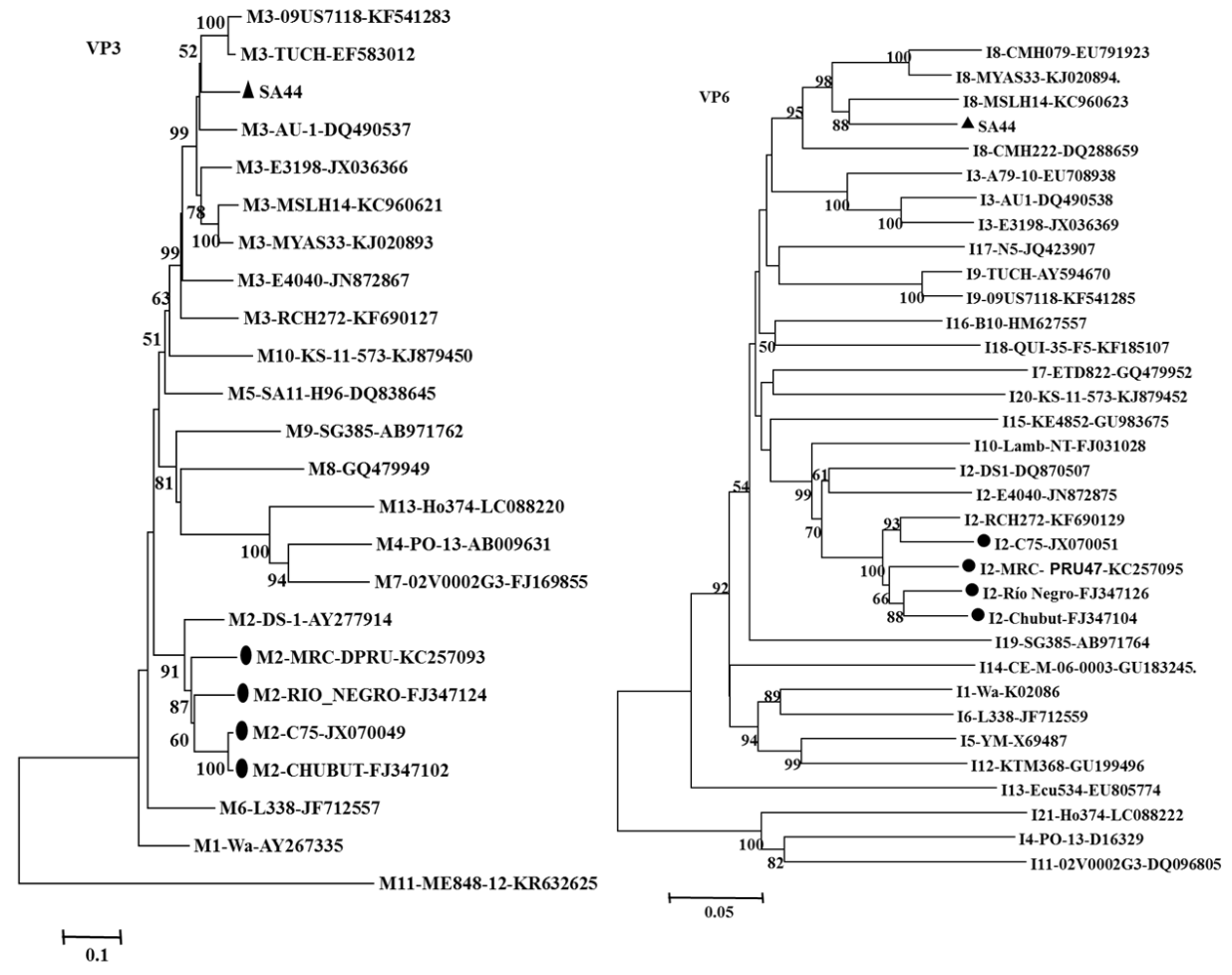


Figura 20-2

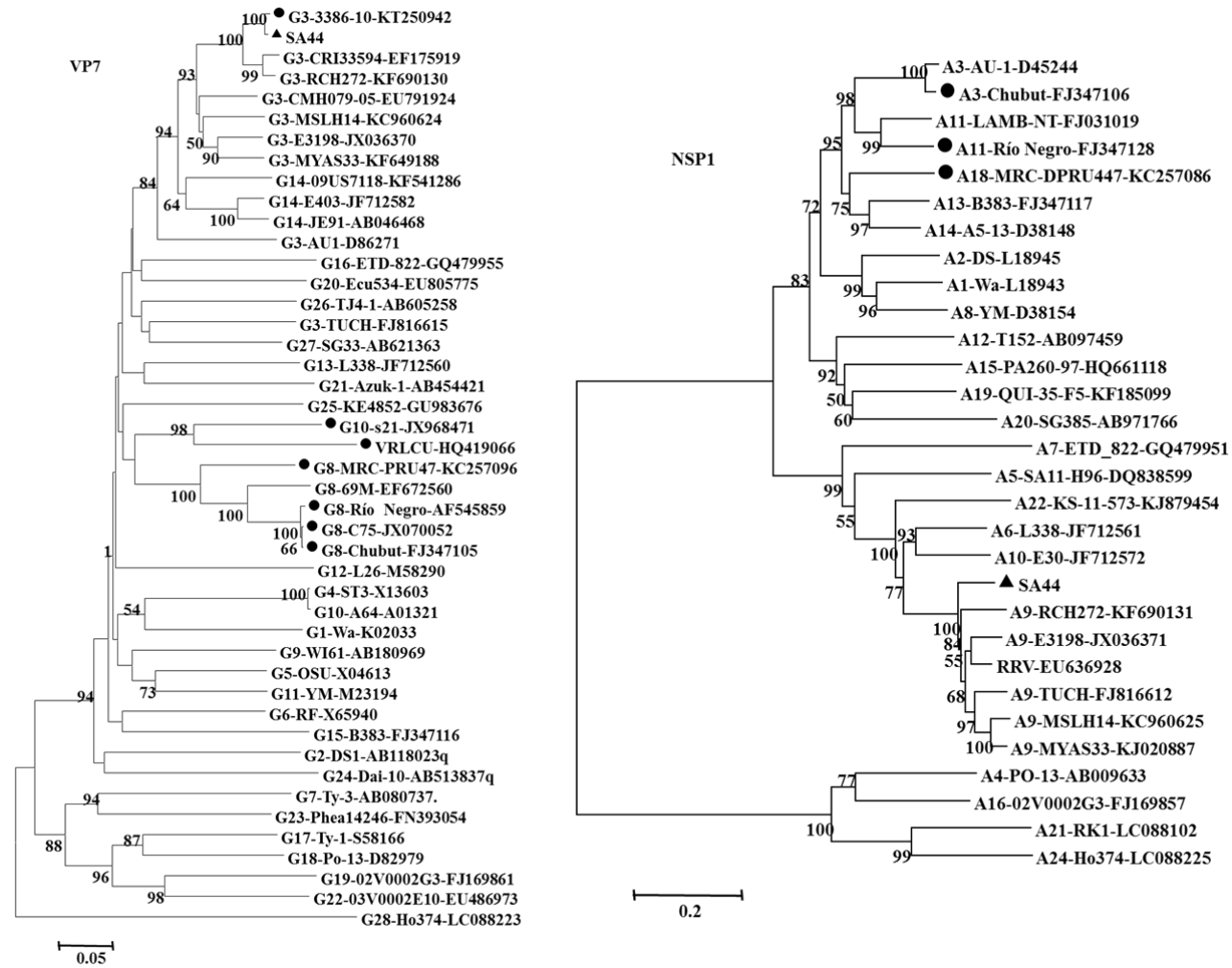


Figura 20-3

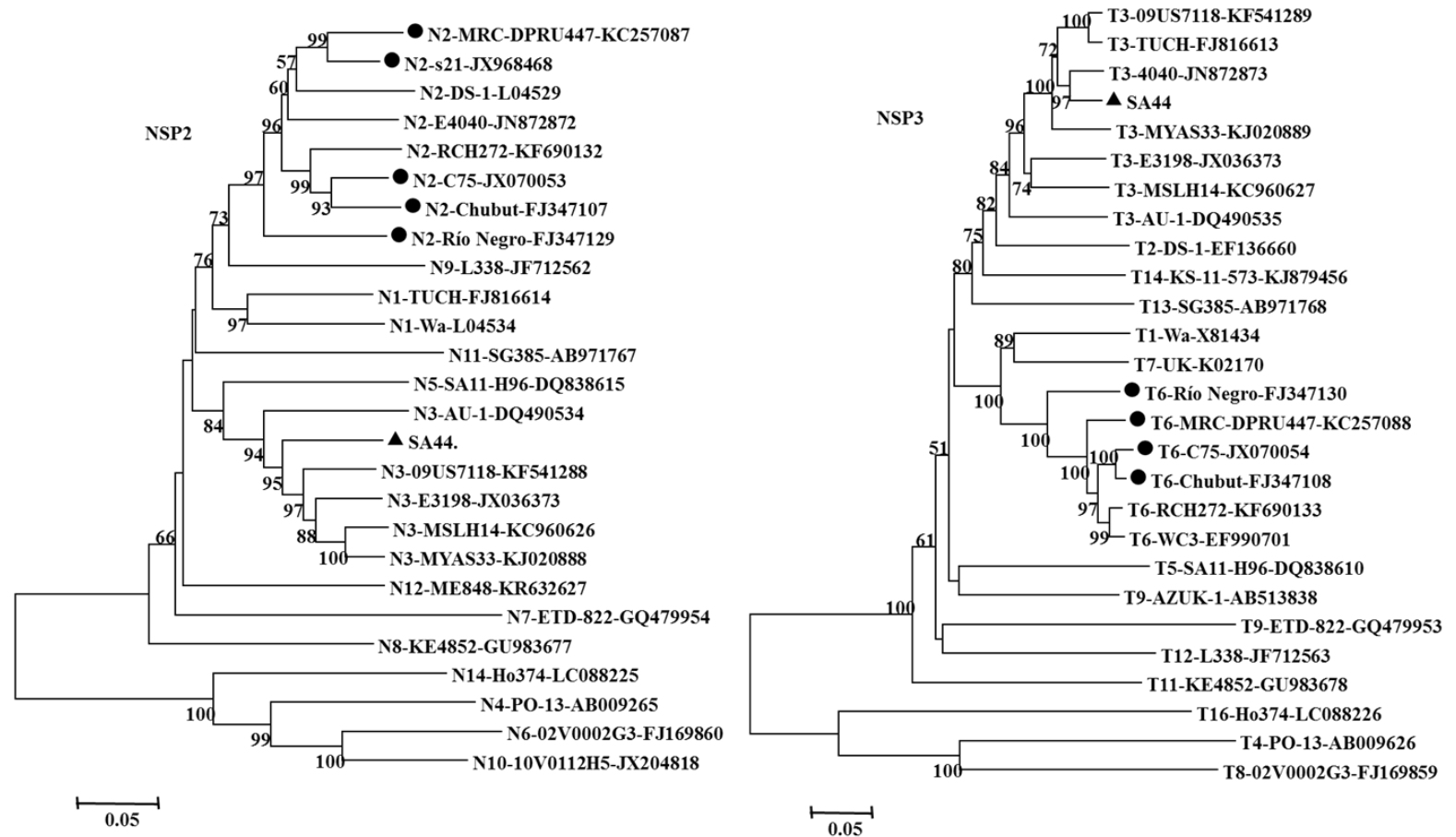


Figura 20-4

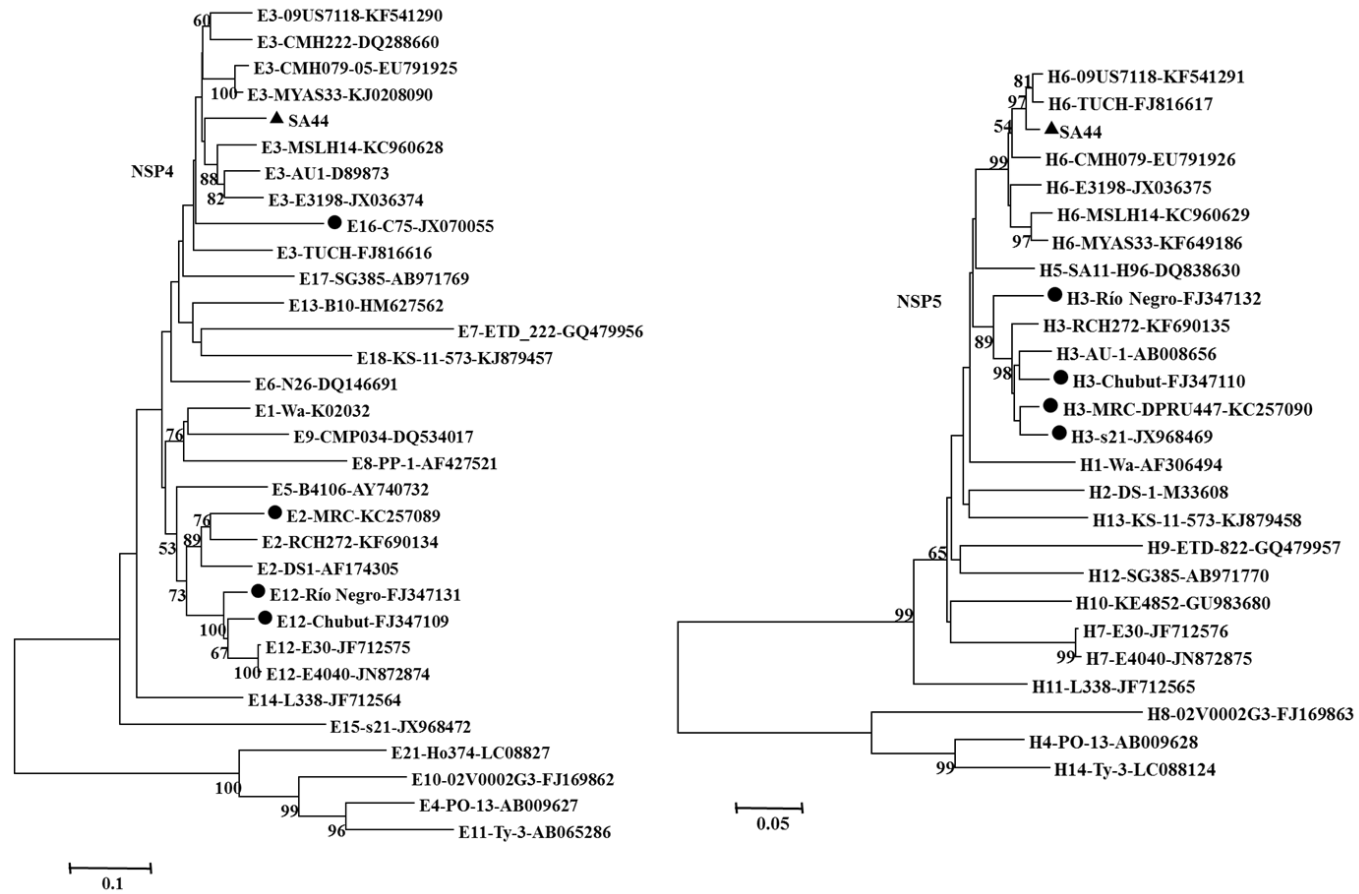
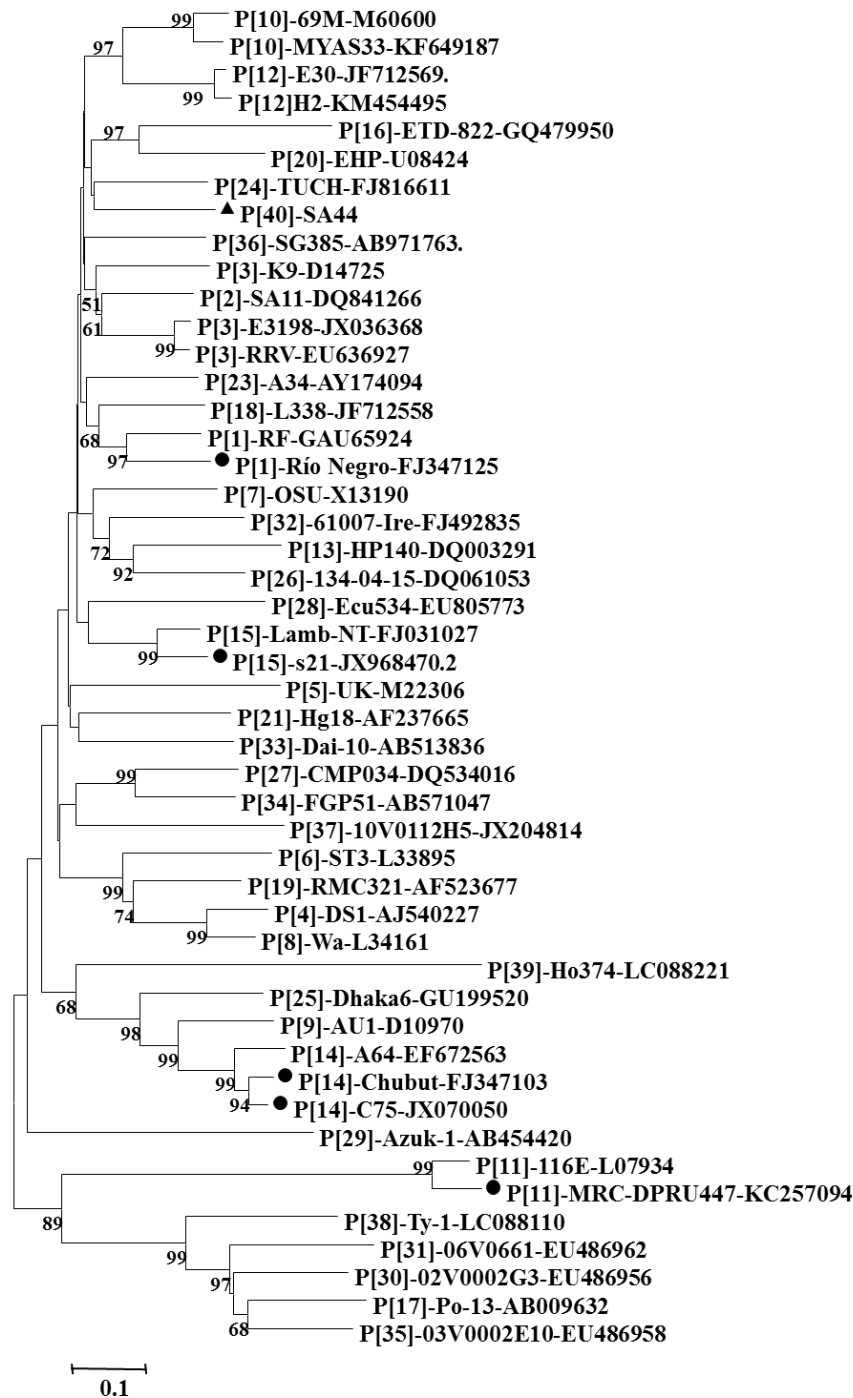


Figura 20-5

**Figura 20.** Dendrogramas construídos a partir da sequência nucleotídica das OFR completas dos genes que codificam VP1-VP3, VP6, VP7 e NSP1-NSP5 da estirpe RVA/Alpacac/PER/SA44/2014/G3P[40] e estirpes de referência.

As distâncias foram corrigidas usando o modelo de *Kimura 2-parameter*. O dendrograma foi construído pelo método de *Maximum Likelihood* e o apoio estatístico foi fornecido por *bootstrapping* de 1000 pseudoreplicatas. Valores de *bootstrap* acima de 75% são dados nos nós do ramo. A escala das distâncias está em substituições/sítio. Estirpes marcadas com triângulo preto indicam segmentos genômicos da estirpe SA44. Estirpes de outros camelídeos estão marcadas com círculo preto. 20-1: dendrogramas construídos a partir da sequência nucleotídica de VP1 e VP2; 20-2: dendrogramas construídos a partir da sequência nucleotídica de VP3 e VP6; 20-3: dendrogramas construídos a partir da sequência nucleotídica de VP7 e NSP1; 20-4: dendrogramas construídos a partir da sequência nucleotídica de NSP2 e NSP3; 20-5: dendrogramas construídos a partir da sequência nucleotídica de NSP4 e NSP5. As amostras de referência estão identificadas pelo número de acesso no *GenBank*.



**Figura 21.** Dendrograma construído a partir da sequência completa da VP4 de estirpes de RVA.

As distâncias foram corrigidas usando o modelo de *Kimura 2-parameter*. O dendrograma foi construído pelo método de *Maximum Likelihood* e o apoio estatístico foi fornecido por *bootstrapping* de 1000 pseudoreplicatas. Valores de *bootstrap* acima de 75% são dados nos nós do ramo. A escala das distâncias está em substituições/sítio. Estirpes marcadas com triângulo preto indicam segmentos genômicos da estirpe SA44. Estirpes de outros camelídeos estão marcadas com círculo preto. As amostras de referência estão identificadas pelo número de acesso no *GenBank*.

### **5.5. Avaliação da ocorrência de infecções interespecies na população estudada**

Estirpes apresentando os genótipos G1 ou G3, P[8] ou P[40], I1, ou I8, E1 ou E3, H1, ou H6, foram detectadas em, pelo menos, três das espécies estudadas. As análises filogenéticas destas estirpes revelaram um elevado grau de identidade entre elas. Este fato, associado a ocorrência de um número extremamente elevado de coinfeções (77%) e de condições sanitárias precárias, incluindo a coabitação de diferentes espécies, cria um ambiente propício para a ocorrência de infecções interespecies e reagrupamento entre estirpes homólogas e heterólogas.



## 6. Discussão

Antes da introdução dos programas de vacinação contra a rotavirose, a diarreia causada por RVA resultava em aproximadamente meio milhão de óbitos em crianças menores de cinco anos de idade em todo o mundo, o que corresponde a 37% dos óbitos atribuídos à diarreia e 5% de todos os óbitos entre crianças menores de cinco anos de idade (Tate *et al.*, 2012). A utilização em larga escala das vacinas contra rotavirose tem sido eficiente na redução da hospitalização devido à doença em diversos países (Braeckman *et al.*, 2012; Payne *et al.*, 2013; Hemming-Harlo *et al.*, 2016; Luchs *et al.*, 2016; Velázquez *et al.*, 2017). Entretanto, a despeito do sucesso da vacinação entre crianças menores de cinco anos, estudos têm demonstrado que a rotavirose continua persistindo na população, entre crianças mais velhas não vacinadas, idosos e indivíduos imunocomprometidos de todas as idades (Anderson *et al.*, 2012; Markkula *et al.*, 2017). Além disso, a vacinação parece exercer pressão seletiva nas estirpes circulantes de RVA e, conseqüentemente, genótipos novos e incomuns têm emergido (Markkula *et al.*, 2017). Por exemplo, na América Latina, particularmente no Brasil, estirpes G2P[4], que normalmente circulavam na região em baixa frequência (Santos e Hoshino, 2005), tornaram-se predominantes por muitos anos após a introdução da vacina Rotarix™ (Gurgel *et al.*, 2007; Correia *et al.*, 2010; Sá *et al.*, 2015). Após a introdução da vacina RotaTeq™ estirpes com características incomuns como G3P[8], e o novo genótipo G12P[8] tornaram-se comuns nos Estados Unidos e na Finlândia, respectivamente (Hemming *et al.*, 2013; Payne, *et al.*, 2013). Entretanto, as vacinas disponíveis são eficientes contra a diarreia grave associada a estes novos genótipos (Correia *et al.*, 2010; Payne, *et al.*, 2015; Hemming-Harlo *et al.*, 2016; Markkula *et al.*, 2017).

O potencial zoonótico dos RVA tem sido demonstrado através da vasta diversidade de estirpes detectadas em humanos que possuem alto grau de identidade genética com estirpes de origem animal (Matthijnsens *et al.*, 2010a; Ghosh e Kobayashi, 2011 e 2014; Bányai *et al.* 2012 Dóro *et al.*, 2015; Marton *et al.*, 2017; Yodmeeklin *et al.*, 2017). Este fato, aliado a pressão seletiva exercida pela vacinação, torna fundamental a vigilância contínua das estirpes de RVA circulantes na população humana e animal.

Este estudo teve como principal objetivo realizar a detecção e identificação das estirpes de RVA circulantes entre animais e seres humanos que coabitam estreitamente no departamento de Cusco, no Peru. Embora a vacinação contra a rotavirose tenha sido oficialmente introduzida no Peru em 2009, não existe nenhum estudo sistemático de avaliação de eficácia da vacina no país, entretanto os poucos dados existentes sugerem uma redução no número de casos de gastroenterite aguda no período pós-vacinação (Grupo

Tematico de Vigilancia de Enfermedades Diarreicas Agudas y Cólera, 2011; Chang *et al.*, 2015). Da mesma forma, informações sobre a epidemiologia das estirpes de RVA circulantes antes ou depois da vacina ser introduzida, são bastante limitadas.

A região do estudo compreende uma área rural onde coabitam seres humanos, animais de criação e de companhia, e carente de serviços básicos de saneamento e saúde. Nossos dados demonstraram uma ampla circulação deste patógeno em todas as espécies estudadas na região.

Infecções por RVA já foram descritas entre CSA (alpacas, lhamas, guanacos e vicunhas). Na Argentina, Badarraco e colaboradores (2013), demonstraram uma taxa de infecção de 3,4% (2/59) entre vicunhas criadas em cativeiro, utilizando EIA para detecção de antígenos virais. Contudo, um estudo soropidemiológico realizado na mesma região demonstrou 100% (n = 44) de positividade para anticorpos anti-RVA, indicando a ampla disseminação desta infecção entre estes animais (Marcoppido, Parreño e Vilá, 2010). Nesta mesma região, Marín (2009), demonstrou 100% de positividade para anticorpos anti-RVA em lhamas (n = 430). Também na Argentina, Parreño e colaboradores (2001), mostraram a circulação do vírus em 3,8% (2/53) dos guanacos utilizando PAGE, embora anticorpos anti-RVA tenham sido detectados em 95% dos animais (45/47). Entre alpacas, no Peru, estudos prévios realizados no departamento de Cusco, demonstraram a infecção por RVA, através de EIA, com taxas de infecção variando de 3,1 a 16% (Morales, Paredes e Pezo, 2007, López, Chamorro e Garmendia, 2011).

Neste estudo, foi empregada a técnica de RT-PCR, sendo encontrada uma frequência de 20,3% (39/192) e 47,5% (19/40) entre alpacas e lhamas, respectivamente, um valor significativamente mais elevado em relação aos estudos anteriores. Possivelmente esta diferença deve-se a utilização de metodologias de detecção distintas, sendo os métodos moleculares empregados mais sensíveis.

A caracterização genotípica do RVA detectado em camelídeos, até o momento, foi realizada para um número muito limitado de estirpes. A única estirpe de vicunha caracterizada (C75) possui os genótipos G8P[14]. Duas estirpes detectadas em guanacos possuem os genótipos G8P[14] (chubut) e G8P[1] (Rio Negro) (Matthijnssens *et al.*, 2009). Até o momento, foi publicada a caracterização de apenas duas estirpes de alpaca as quais possuem os genótipos G3P[11] (3368-10) e G3P[x] (3386-10) (Garmendia *et al.*, 2015). Nós encontramos uma predominância de estirpes contendo os genótipos G3P[40] entre alpacas e G1P[8] e G3P[8] entre lhamas. Entretanto, nós observamos uma grande diversidade genotípica e um número significativo de coinfeções: 81,3% (13/16) entre as alpacas e 90,1%

(10/11) entre lhamas. Não existe relato na literatura de identificação de genótipos de RVA de lhama, sendo este, portanto, um estudo pioneiro.

Em carneiros foi detectado um 100% (9/9) de positividade para RVA. A frequência deste patógeno em ovinos na América Latina não é conhecida. Estudos em outras áreas do mundo descrevem incidência de até 60%, dependendo das condições epidemiológicas e técnicas de detecção utilizadas, com taxas de mortalidade estimadas em 10 a 15% (Kaminjolo e Adesiyun, 1994; Wani *et al.*, 2004, Wani, Bhat e Ishaq, 2007; Galindo-Cardiel *et al.*, 2011; Gazal *et al.*, 2011, Gazal, Taku e Kumar, 2012; Papp *et al.*, 2014).

As informações sobre os genótipos de RVA detectados em ovinos são muito limitadas. Na Índia, a caracterização de 52 estirpes de RVA ovino demonstrou uma prevalência do genótipo G6 (48%) seguido de G10 (36%) e a maioria das estirpes apresentavam o genótipo P[11] (Gazal *et al.*, 2012). Três estirpes caracterizadas na China (Lp14, Lamb-NT e CC0812), apresentavam os genótipos G10P[15] (Shen, Burke e Desselberger, 1993; Chen *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2011). Na Espanha, foi demonstrada a presença de anticorpos anti-RVA G3, G6 e G10 (Muñoz *et al.*, 1996). Ainda na Espanha foram caracterizadas estirpes apresentando os genótipos G8P[1] (Aragon) (Galindo-Cardiel *et al.*, 2011) e G8P[14] (OVR762) (Matthijnsens *et al.*, 2009b). No Reino Unido, quatro estirpes foram caracterizadas como G3P[1] (LRV1), G6P[11] (LRV2a), G9P[8] (LRV2c) e G10P[14] (K923) (Fitzgerald *et al.*, 1995). Nós encontramos os genótipos G1, G3 e G20 e P[1], P[8], P[14] P[40], além de um possível novo genótipo P[?]; todas as amostras apresentavam coinfeções.

No caso de seres humanos, a frequência descrita para RVA entre crianças peruanas varia de 28%-52%, sendo estes dados predominantemente obtidos a partir de crianças hospitalizadas nas áreas urbana e periurbana de Lima (Greenberg *et al.*, 1991; Figueroa-Quintanilla *et al.*, 1993; Cama *et al.*, 1999; Luna *et al.*, 2008). Por outro lado, estudos realizados na região dos Andes, descrevem uma positividade para RVA, demonstrada por EIA, de 19,7% (Ehrenkranz *et al.*, 2001) e 35,9% por RT-PCR (Espejo *et al.*, 2014). Neste estudo, realizado entre habitantes da população de uma área rural dos Andes, foi observada positividade de 33,3%. Entretanto, é importante considerar que o número de amostras fecais humanas analisadas em nosso estudo foi pequeno (n = 24).

Infelizmente, informações sobre os genótipos de RVA circulantes na população humana no Peru são escassos, não permitindo uma avaliação robusta sobre a diversidade deste vírus no país. Um estudo realizado entre crianças hospitalizadas em Lima, no período de fevereiro de 1995 a fevereiro de 1997, descreveu a predominância dos genótipos G1 e G2 (68% e 21%), G3 foi detectado em 1% das amostras (Cama *et al.*, 1999). Um estudo realizado entre crianças

hospitalizadas na cidade de Cajamarca, localizada na região nordeste dos Andes, no período de janeiro de 2010 e dezembro de 2012, após a introdução da vacina no Peru, encontrou uma predominância dos genótipos G9 e G12 (35,7% e 33,3%, respectivamente); G3 foi o terceiro genótipo mais comum (16,7%) (Espejo *et al.*, 2014); contudo, o estudo não fornece dados mais específicos sobre a população avaliada, assim não sabemos se estas crianças eram moradoras de áreas rurais ou se tinham contato direto com animais de companhia ou criação.

Nosso estudo envolveu crianças, não hospitalizadas, habitantes de uma comunidade rural e em permanente contato íntimo com animais de companhia e criação. O genótipo G3 (87,5%; 7/8) foi o único identificado entre as amostras de RVA detectadas em humanos. Para VP4 foi observada uma maior diversidade sendo o novo genótipo P[40] predominante (87,5%; 7/8). Os genótipos P[2], P[6], P[8] e P[14] foram encontrados em menor frequência, além de um possível novo genótipo P[?]. A combinação G-P mais frequente foi G3P[40] (87,5%, 7/8) e 75% das amostras apresentaram coinfeção entre diferentes estirpes de RVA. No estudo de Espejo e colaboradores (2014), foram encontrados os genótipos P[6] (45,2%), P[8] (26,2%) e P[4] (4,8%). As combinações G-P mais frequentes foram G12P[6] (23,8%), G9P[6] (19%) e G9P[8] (11,9%), não tendo sido descrito a ocorrência de coinfeções.

Um achado importante deste trabalho foi a descrição de um novo genótipo P, circulando entre todas as espécies estudadas. Este novo genótipo foi inicialmente detectado na estirpe SA44, isolada de uma amostra fezes de uma alpaca neonata com diarreia, pertencente ao rebanho de Silli, colhida em fevereiro de 2014. A estirpe SA44 foi adaptada em cultura de células MA-104 e o genoma completo foi sequenciado.

Como mencionado anteriormente, poucas estirpes de RVA detectadas em camelídeos foram completamente caracterizadas. A estirpe C75, detectada em vicunha na Argentina, exhibe a constelação genômica bovino-like G8-P[14]-I2-R2-C2-M2-Ax-N2-T6-E16-Hx, semelhante às estirpes encontradas em cabras, carneiros, antílopes, búfalos e várias estirpes P[14] de origem humana (Badaracco *et al.*, 2013). As estirpes chubut e Rio Negro, detectadas em guanaco, também na Argentina, exibem as constelações genômicas, G8-P[14]-I2-R5-C2-M2-A3-N2-T6-E12-H3 e G8-P[1]-I2-R5-C2-M2-A11-N2-T6-E12-H3, respectivamente, possuem vários genótipos em comum com estirpes de humanos e animais, incluindo bovino, ovino e antílopes (Matthijssens *et al.*, 2009b). As estirpes MRC-PRU47 e s21, detectadas em camelos no Sudão e no Kuwait, exibem as constelações genômicas G8-P[11]-I2-R2-C2-M2-A18-N2-T6-E2-H3 e G10-P[15]-I1-R1-C2-Mx-Ax-N2-T2-E15-H3, respectivamente (Papp *et al.*, 2012; Jere *et al.*, 2014), sugestivo de uma estreita relação entre estirpes RVA de

camelídeos e outros membros da ordem *Artiodactyla*, particularmente bovinos. Curiosamente, nenhum dos segmentos do genoma da SA44 foi representativo de um genótipo bovino-*like*.

A constelação genética da estirpe SA44 se mostrou quase idêntica (10/11 segmentos, G3-I8-R3-C3-M3-A9-N3-T3-E3-H6) às de estirpes de morcegos detectadas na Ásia RVA/Bat-tc/MSLH14/2012/G3P[3] e RVA/Bat-tc/CHN/MYAS33/2013/G3P[10] (He *et al.*, 2013; Xia *et al.*, 2014). SA44 possui nove dos seus 11 segmentos genômicos (G3-R3-C3-M3-A9-N3-T3-E3-H6) semelhantes a uma estirpe incomum detectada em cavalo na Argentina, RVA/Horse-wt/ARG/E3198/2008/G3P[3] (Miño *et al.*, 2013). O genótipo I8 (VP6) da estirpe SA44 é um genótipo raro previamente identificado somente em quatro estirpes: duas de morcego MSLH14 e MYAS33 (He *et al.*, 2013; Xia *et al.*, 2014), e duas estirpes morcego-*like* detectadas em humanos na Tailândia CMH079 e CMH222 (Khamrin *et al.*, 2006; 2009). Todavia, a análise filogenética mostrou uma relação próxima entre SA44 e as estirpes humanas RCH272 detectada na Austrália (Donato *et al.*, 2014), 2012841174 e 09US7118 detectadas nos Estados Unidos (Mijatovic-Rustempasic *et al.*, 2015) em quatro dos 11 segmentos gênicos (VP1, VP2, NSP1 e NSP2). Estes achados sugerem que a estirpe SA44 emergiu de múltiplos eventos de reagrupamento entre estirpes morcego-*like*, cavalo-*like* e humanos-*like*. Supreendentemente, o genótipo P[40] foi detectado entre todas as espécies estudadas (alpacas, 31,2%; lhamas 21%, carneiros 25% e humanos 50%), nos dois sítios de coleta.

Uma segunda estirpe de alpaca, Alp11B, também possui um genótipo P distinto. Contudo, como a adaptação desta estirpe em cultura de células não foi bem-sucedida, ainda não foi possível completar o sequenciamento deste segmento do RNA. Mas, já conseguimos obter aproximadamente 76% da ORF da VP4 (1799 de 2362 pb). Esperamos brevemente concluir a ORF completa para submetemos ao RCWG para confirmação de um novo genótipo. A sequência da Alp11B foi filogeneticamente mais próxima 75,9% de identidade nucleotídica, do genótipo P[28] identificado em uma estirpe de RVA (Ecu534) detectada em uma criança com diarreia no Equador em 2009, a qual possui a peculiar constelação genômica, G20-P[28]-I13, sendo a única estirpe já descrita, até então, contendo os genótipos P[28] e I13 (Solberg *et al.*, 2009). Curiosamente, a estirpe Alp11B também apresenta o genótipo I13, bem como a estirpe Alp11A. Duas estirpes SA28 (alpaca) e L27 (lhama) apresentaram um genótipo P semelhante à estirpe Alp11B. Estas amostras foram obtidas em um intervalo relativamente curto de tempo (2010-2014), as sequências são bastante conservadas, apresentando 98% a 100% de identidade nucleotídica, não havendo, portanto, grande variação intra genotípica.

Outro achado inesperado foi a detecção dos genótipos G20, I8 e E16. O genótipo G20 foi identificado em quatro amostras (duas de alpaca e duas de carneiro). Este genótipo foi encontrado anteriormente na estirpe Ecu534 (G20-P[28]-I13-Rx-Cx-Mx-Ax-Nx-Tx-Ex-Hx) (Solberg *et al.*, 2009), em uma estirpe detectada em morcego no Brasil (3081, G20-P[x]-Ix-Rx-Cx-Mx-Ax-Nx-T15-Ex-H15) (Asano *et al.*, 2016) e na estirpe morcego KCR10-93 G20-P[x]-Ix-Rx-Cx-Mx-Ax-Nx-Tx-Ex-Hx) detectada na Costa Rica (Corman, Everling e Drexler, 2014). Infelizmente, somente conseguimos obter a sequência da estirpe Alp11B, que apresentou 79% de identidade nucleotídica com a estirpe de referência Ecu534, e 79,2% com a estirpe 3081, abaixo do valor de corte de 80% para identificação de genótipo G, embora tenha apresentado 92,7% de identidade com a estirpe KCR10-93, podendo representar uma linhagem distinta dentro do genótipo G20. É preciso analisar um número maior de sequências para esclarecer este fato. No momento, já obtivemos 840 pb da ORF da VP7 (1069 pb) e esperamos brevemente concluir a ORF completa para submetermos a avaliação do RCWG.

O genótipo I8 foi identificado em 16 amostras (10 de alpacas, duas de lhamas e quatro de humanos) e somente havia sido detectado anteriormente em quatro estirpes na Ásia (Khamrin *et al.*, 2006; 2009; He *et al.*, 2013; Xia *et al.*, 2014). Desta forma, com os dados deste estudo, o genótipo I8 já foi encontrado em humanos, camelídeos e quirópteros, sugerindo que estas estirpes possam ter se originado a partir de múltiplos eventos de recombinação interespecíes. De fato, a análise filogenética da estirpe CMH222 (G3-P[3]-I8-E3), revelou uma origem evolutiva comum dos genes que codificam VP4 e VP6, com estirpes de símio e VP7 e NSP4 com estirpes de caprino (Khamrin *et al.*, 2006). Por outro lado, a estirpe CMH079 (G3-P[10]-I8-E3-H6), apresentou uma origem evolutiva comum com estirpes de caprinos (VP7 e VP6) e humanos (VP4, NSP4 e NSP5) (Khamrin *et al.*, 2009).

A única estirpe anteriormente descrita contendo o genótipo E16 foi detectada em vicunha na Argentina (C75) (Badaracco *et al.*, 2013). Nós encontramos três estirpes de alpacas (Alp11A, Alp11B e Alp22), coletadas em Silli em 2010, contendo este genótipo.

A análise filogenética também revelou a circulação de diferentes linhagens dos genótipos G3 e I2. As estirpes do genótipo G3.1, foram filogeneticamente mais próximas de estirpes originárias de humanos, alpacas e morcego e as estirpes do genótipo G3.2 mais próximas de estirpes símias. As estirpes do genótipo I2.1 foram filogeneticamente mais próximas de estirpes de origem bovina, enquanto as estirpes I2.2 foram mais próximas de estirpes símias. Estas diferentes linhagens comumente emergem a partir do acúmulo de mutações pontuais que resultam em variações intratípicas que podem resultar da adaptação do vírus a novos hospedeiros (Dóro *et al.*, 2016), e já foram anteriormente descritas para os

genes que codificam as proteínas VP6 (Iturriza-Gómara *et al.*, 2002), NSP4 (Kirkwood, Gentsch e Glass, 1999; Ciarlet *et al.*, 2000), VP7 e VP4 (Gouvea e Santos, 1999; Iturriza-Gómara *et al.*, 2000, 2001, Dóro *et al.*, 2016).

Outro dado peculiar deste estudo foi a elevada taxa de coinfeções encontrada (84,5%); 33 das 39 amostras genotipadas por *multiplex* PCR apresentaram infecções por duas, três ou quatro diferentes estirpes. A ocorrência de coinfeção é o requisito fundamental para que possam ocorrer eventos de reagrupamentos dos segmentos de RNA genômico entre estirpes homólogas e/ou heterólogas (Ramig 1997, Iturriza-Gómara, Desselberger e Gray, 2003; Dóro *et al.*, 2015). A alta taxa de coinfeção associada à coabitação de diferentes espécies em uma mesma área cria um cenário propício para a ocorrência de transmissão interespecies de patógenos

No sistema de criação de CSA intenta-se sempre manter separadas as alpacas e as lhamas para evitar o acasalamento indesejado entre elas, o que resulta na baixa qualidade da fibra nas crias, assim as alpacas ficam confinadas em um setor e as lhamas e os ovinos ficam juntos em outro. Contudo, em comunidades rurais como Silli, este sistema não é respeitado devido à falta da infraestrutura apropriada. Outra particularidade destas comunidades é que os pastores ficam em contato íntimo com os animais, particularmente os ovinos, que por serem de pequeno porte, pelo pequeno número de animais por rebanho (quatro a cinco animais) e pelo fato de estes não suportarem o frio no campo, são mantidos dentro das casas durante a noite. Este ambiente cria as condições necessárias para a ocorrência de infecções interespecies.

Como existe uma escassez de informações sobre as estirpes de RVA que comumente infectam camelídeos, ovinos e humanos no Peru, é difícil precisar com segurança a origem das estirpes detectadas neste estudo. Contudo as análises filogenéticas apontam para a ocorrência de estirpes reagrupadas e para a ocorrência de transmissão interespecies. Por exemplo, estirpes pertencentes aos genótipos G1, P[8], E1 e H1 são comumente detectadas entre humanos (Matthijnssens *et al.*, 2011a), mas foram detectadas em alpacas, lhamas e carneiros; estirpes I1, também comumente encontradas em seres humanos (Matthijnssens *et al.*, 2011a) foram detectadas em alpacas e lhamas. Da mesma forma, estirpes pertencentes aos genótipos I8, E3, H1 e H6, que são comumente detectadas em animais (Matthijnssens *et al.*, 2011a) foram detectadas em seres humanos. O genótipo P[40], que parece ter emergido a partir de recombinações entre estirpes de diferentes espécies, foi detectado alpacas, lhamas, carneiros e humanos.

Dentre as seis amostras apresentando infecção por uma única estirpe (Alp11A, H15, SA44 [alpaca], L28 [lhama], LAO e ADR [humanos]), pelo menos cinco delas apresentam constelação genômica sugestiva de estirpes zoonóticas: Alp11A (G8-P[x]-I13-E16-H6), L28 (G1-P[x]-I1-E1-H1), SA44 (G3-P[40]-I8-E3-H6), LAO (G3-P[40]-I8-E3-H6) e ADR (G3-P[40]-I8-E3-H1). Destas, as estirpes SA44 e LAO possuem homologia entre os todos genes estudados a entre quatro dos cinco genes com a estirpe ADR. Este dado é fortemente indicativo da ocorrência de transmissão interespecífica.

Phan e colaboradores (2016) estudaram a diversidade genotípica das estirpes de RVA entre humanos e suínos na região do delta do rio Mekong, Vietnã, e demonstraram a circulação de estirpes apresentando a constelação genômica G4-P[6]-I1-R1-C1-M1-A8-N1-T7-E1-H1 entre seres humanos e animais, evidenciando assim a transmissão zoonótica do vírus. Coinfecções foram detectadas em 14,3% das amostras positivas para RVA. Uma característica importante do estudo é a proximidade das espécies estudadas e o uso comum da água do rio Mekong (Phan *et al.*, 2016).

Em virtude das características da população humana e animal de nosso estudo, isto é, coabitação entre diferentes espécies hospedeiras em condições de saneamento e higiene precárias, a ocorrência de zoonoses é uma possibilidade real. Desta forma, esperamos que os dados gerados neste trabalho, possam de alguma forma, influenciar na melhoria da qualidade de vida desta população, através da implantação de medidas de prevenção e controle de doenças infecciosas e combate a pobreza.



## 7. Conclusões

1. Das 265 amostras de fezes coletadas das diferentes espécies estudadas, 91 (34,3%) foram positivas para RVA.
2. A distribuição das amostras positivas entre as diferentes espécies foi 28,6% positividade entre as alpacas, 47,5% entre as lhamas, 100% entre os carneiros e 33,3% entre os humanos.
3. Para a VP7 (G) os genótipos identificados foram: G3 (52%; 27/52), G1 (25%, 13/52), G20 (7,7%, 4/52) e G8 (5,8%, 3/52).
4. Para a VP4 (P) foram identificados seis diferentes genótipos: P[40] (30,8%, 24/78), P[8] (20,5%; 16/78), P[?; possível novo genótipo] (12,8%, 10/78), P[2] (11,5%, 9/78), P[14] (7,7%, 6/78), P[1] (6,4%, 5/78) e P[6] (2,6%, 2/78).
5. Para VP6 (I) foram identificados quatro genótipos: I1 (34,7%, 17/49), I8 (32,7%, 16/49), I2 (8,2%, 4/49) e I13 (8,2%, 4/49).
6. Para NSP4 (E) foram identificados quatro genótipos: E1 (35,2%, 19/54), E3 (35,2%, 19/54), E2 (20,4%, 11/54), e E16 (7,4%, 4/54).
7. Para NSP5 foram identificados quatro diferentes genótipos: H1 (41,1%, 23/56), H6 (33,9%, 19/56), H3 (14,3%, 8/56) e H5 (10,7%, 6/56).
8. As estirpes de RVA circulando no departamento de Cuzco, Peru, possivelmente apresentam as seguintes constelações genômicas majoritárias: alpaca – G3-P[40]-I8-E3-H6; lhamas - G1/G3-P[8]-I1-E1-H1; carneiros - G1/G3/2G0-P[1]/P[8]-I1-E1-H1 e humanos – G3-P[40]-I1/I8-E3-H1.
9. Foi identificado um novo genótipo de RVA, P[40], circulando entre alpacas, lhamas, carneiros e humanos no departamento de Cusco, Peru.

## 8. Referências Bibliográficas

- Abad, F.X., Pinto, R.M. e Bosch, A. (1997). Disinfection of human enteric viruses on fomites. *FEMS Microbiol. Lett.* 156:107–111.
- Adah, M.I., Rohwedder, A., Olaleye, O.D. e Werchau, H. (1997). Nigerian rotavirus serotype G8 could not be typed by PCR due to nucleotide mutation at the 3' end of the primer-binding site. *Arch. Virol.* 142:1881-1887.
- Adams, W.R. e Kraft, L.M. (1963). Epizootic diarrhea of infant mice: identification of the etiologic agent. *Science*; 141:359-360.
- Aiyegbo, M.S., Sapparapu, G., Spiller, B.W., Eli, I.M., Williams, D.R., Kim, R., Lee, D.E., Liu, T., Li, S., Woods Jr., V.L., Nannemann, D.P., Meiler, J., Stewart, P.L. e Crowe Jr., J.E. (2013). Human rotavirus VP6-specific antibodies mediate intracellular neutralization by binding to a quaternary structure in the transcriptional pore. *PLoS One* 8: e61101.
- Aladin, F., Einerhand, A.W., Bouma, J., Bezemer, S., Hermans, P., Wolvers, D., Bel-Lamy, K., Frenken, L.G., Gray, J. e Iturriza-Gómara, M. (2012). In vitro neutralization of rotavirus infection by two broadly specific recombinant monovalent llama-derived antibody fragments. *PLoS one* 7:e32949; 2012.
- Alfieri, A.A., Leite, J.P., Nakagomi, O., Kaga, E., Woods, P.A., Glass, R.I. e Gentsch, J.R. (1996). Characterization of human rotavirus genotype P[8]G5 from Brazil by probe-hybridization and sequence. *Arch. Virol.* 141:2353-2364.
- Alfieri, A.A., Alfieri, A.F., Takiuchi, E. e Lobato, Z.I.P. (2007). Reoviridae. In: *Virologia Veterinária*, 1ª edição, Flores, E.F. ed. (Rio Grande do Sul, Editora UFSM), pp. 773-807.
- American Academy of Pediatrics. (1996). Practice parameter: the management of acute gastroenteritis in young children. Provisional Committee on Quality Improvement, Subcommittee on Acute Gastroenteritis. *Pediatrics* 97:424–435.
- Anderson, E.J., Katz, B.Z., Polin, J.A., Reddy, S., Weinrobe, M.H. e Noskin, G.A. (2012). Rotavirus in adults requiring hospitalization. *J. Infect.* 64:89-95.
- Appaiahgari, M.B., Glass, R., Singh, S., Taneja, S., Rongsen-Chandola, T., Bhandari, N., Mishra, S. e Vрати, S. (2014). Transplacental rotavirus IgG interferes with immune response to live oral rotavirus vaccine ORV-116E in Indian infants. *Vaccine* 32:651–656.
- Asano, K.M., Gregori, F., Hora, A.S., Scheffer, K.C., Fahl, W.O., Iamamoto, K., Mori, E., Silva, F.D., Taniwaki, S.A e Brandão, P.E. Group A rotavirus in Brazilian bats: description of novel T15 and H15 genotypes. *Arch. Virol.* 161:3225-3230.
- Badaracco, A., Matthijnsens, J., Romero, S., Heylen, E., Zeller, M., Garaicoechea, L., Van Ranst, M. e Parreño, V. (2013). Discovery and molecular characterization of a group A rotavirus strain detected in an Argentinean vicuña (*Vicugna vicugna*). *Vet. Microbiol.* 161:247-254.
- Bányai, K., Gentsch, J.R., Schipp, R., Jakab, F., Meleg, E., Mihály, I. e Szücs, G. (2005). Dominating prevalence of P[8],G1 and P[8],G9 rotavirus strains among children admitted to hospital between 2000 and 2003 in Budapest, Hungary. *J. Med. Virol.* 76:414-423.
- Bányai, K., Martella, V., Molnár, P., Mihály, I., van Ranst, M. e Matthijnsens, J. (2009). Genetic heterogeneity in human G6P[14] rotavirus strains detected in Hungary suggests independent zoonotic origin. *J. Infect.* 59:213-215.
- Bányai, K., László, B., Duque, J., Steele, A.D., Nelson, E.A., Gentsch, J.R. e Parashar UD. (2012). Systematic review of regional and temporal trends in global rotavirus strain diversity in the pre rotavirus vaccine era: insights for understanding the impact of rotavirus vaccination programs. *Vaccine* 30 Suppl 1:A122-130.

- Bányai, K., Kemenesi, G., Budinski, I., Földes, F., Zana, B., Marton, S., Varga-Kugler, R., Oldal, M., Kurucz, K. e Jakab, F. (2016). Candidate new rotavirus species in Schreiber's bats, Serbia. *Infect. Genet. Evol.* 2016 Dec 6;48:19-26. doi: 10.1016/j.meegid.2016.12.002. [Epub ahead of print].
- Barro, M. e Patton, J.T. (2005). Rotaviruses nonstructural protein 1 subverts innate immune response by inducing degradation of inf regulatory factor 3. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102:4114-4119.
- Barro, M. e Patton, J.T. (2007). Rotavirus NSP1 inhibits expression of type I interferon by antagonizing the function of interferon regulatory factors IRF3, IRF5, and IRF7. *J. Virol.* 81:4473-4481.
- Bishop, R.F., Davidson, G.P., Holmes, I.H. e Ruck, B.J. (1973). Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. *Lancet*; 2:1281-1283.
- Blackhall, J., Fuentes, A. e Magnusson, G. (1996). Genetic stability of a porcine rotavirus RNA segment during repeated plaque isolation. *Virology* 225:181-190.
- Braeckman, T., Van Herck, K., Meyer, N., Pirçon, J.Y., Soriano-Gabarró, M., Heylen, E., Zeller, M., Azou, M., Capiou, H., De Koster, J., Maernoudt, A.S., Raes, M., Verdonck, L., Verghote, M., Vergison, A., Matthijnsens, J., Van Ranst, M., Van Damme, P. e RotaBel Study Group. (2012). Effectiveness of rotavirus vaccination in prevention of hospital admissions for rotavirus gastroenteritis among young children in Belgium: case-control study. *BMJ.* 345:e4752.
- Burns, J.W., Siadat-Pajouh, M., Krishnaney, A.A. e Greenberg, H. (1996). Protective effect of rotavirus VP6-specific IgA monoclonal antibodies that lack neutralizing activity. *Science* 272:104-107.
- Cama, R.I., Parashar, U.D., Taylor, D.N., Hickey, T., Figueroa, D., Ortega, Y.R., Romero, S., Perez, J., Sterling, C.R., Gentsch, J.R., Gilman, R.H. e Glass, R.I. (1999). Enteropathogens and other factors associated with severe disease in children with acute watery diarrhea in Lima, Peru. *J. Infect. Dis.* 179:1139-1144.
- Campagna, M., Eichwald, C., Vascotto, E. e Burrone, O.R. (2005). RNA interference of rotavirus segment 11 mRNA reveals the essential role of NSP5 in the virus replicative cycle. *J. Gen. Virol.* 86:1481-1487.
- Chang, M.R., Velapatiño, G., Campos, M., Chea-Woo, E., Baiocchi, N., Cleary, T.G. e Ochoa, T.J. (2015). Rotavirus seasonal distribution and prevalence before and after the introduction of rotavirus vaccine in a peri-urban community of Lima, Peru. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 92:986-988.
- Chen, Y., Zhu, W., Sui, S., Yin, Y., Hu, S. e Zhang, X. (2009). Whole genome sequencing of lamb rotavirus and comparative analysis with other mammalian rotaviruses. *Virus Genes* 38:302-310.
- Chizhikov, V., Wagner, M., Ivshina, A., Hoshino, Y., Kapikian, A.Z. e Chumakov, K. (2002). Detection and genotyping of human group A rotaviruses by oligonucleotide microarray hybridization. *J. Clin. Microbiol.* 40:2398-2407.
- Ciarlet, M. e Estes, M. K. (1999). Human and most animal rotavirus strains do not require the presence of sialic acid on the cell surface for efficient infectivity. *J. Gen. Virol.* 80:943-948.
- Ciarlet, M., Liprandi, F., Conner, M.E. e Estes, M.K. (2000). Species specificity and interspecies relatedness of NSP4 genetic groups by comparative NSP4 sequence analyses of animal rotaviruses. *Arch. Virol.* 145:371-383.
- Cook N., Bridger, J., Kendall, K., Gomara, M.I., El-Attar, L. e Gray, J. (2004). The zoonotic potential of rotavirus. *J. Infect. Dis.* 48:289-302.
- Corman, V.M., Everling, U. e Drexler, J.F. (2014). Highly diversified bat rotaviruses from Africa, America and Europe. (GenBank record). Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KM214442>. Acesso em 18/01/2017.
- Correia, J.B., Patel, M.M., Nakagomi, O., Montenegro, F.M., Germano, E.M., Correia, N.B., Cuevas, L.E., Parashar, U.D., Cunliffe, N.A. e Nakagomi, T. (2010). Effectiveness of monovalent rotavirus vaccine (Rotarix) against severe diarrhea caused by serotypically unrelated G2P[4] strains in Brazil. *J. Infect. Dis.* 201:363-369.

- Corthésy, B., Benureau, Y., Perrier, C., Fourgeux, C., Perez, N., Greenberg, H. e Schwartz-Cornil, I. (2006). Rotavirus anti-VP6 secretory immunoglobulin A contributes to protection via intracellular neutralization but not via immune exclusion. *J. Virol.* 80:10692–10699.
- Coulson, B.S. (1996). VP4 and VP7 typing using monoclonal antibodies. *Arch. Virol. Suppl* 12:113-118.
- Cunliffe, N.A., Gondwe, J.S., Broadhead, R.L., Molyneux, M.E., Woods, P.A., Bresee, J.S., Glass, R.I., Gentsch, J.R. e Hart, C.A. (1999). Rotavirus G and P types in children with acute diarrhea in Blantyre, Malawi, from 1997 to 1998: predominance of novel P[6]G8 strains. *J. Med. Virol.* 57:308-312.
- Das, B.K., Gentsch, J.R., Hoshino, Y., Ishida, S., Nakagomi, O., Bhan, M.K., Kumar, R. e Glass, R.I. (1993). Characterization of the G serotype and genogroups of New Delhi newborn rotavirus strain 116E. *Virology* 197:99-107.
- Das, B.K., Gentsch, J.R., Cicirello, H.G., Woods, P.A., Gupta, A., Ramachandran, M., Kumar, R., Bhan, M.K. e Glass, R. I. (1994). Characterization of rotavirus strains from newborns in New Delhi, India. *J. Clin. Microbiol.* 32:1820-1822.
- Deal, E. M., Lahl, K., Narváez, C.F., Butcher, E.C. e Greenberg, H.B. (2013). Plasmacytoid dendritic cells promote rotavirus-induced human and murine B cell responses. *J. Clin. Invest.* 123:2464–2474.
- Desselberger U. (2014). Rotaviruses. *Virus Res.* 190:75-96.
- Desselberger, U. (1996). Genome rearrangements of rotaviruses. *Adv. Virus Res.* 46:69–95.
- Dhama, K., Chauhan, R.S., Mahendran, M. e Malik, S.V. (2009). Rotavirus diarrhea in bovines and other domestic animals. *Vet. Res. Commun.* 33:1-23.
- Diwarkarla, C. e Palombo, E. (1999). Genetic and antigenic variation of capsid protein VP7 of serotype G1 human rotavirus isolates. *J. Gen. Viro.* 180:341-344.
- Doan, Y.H., Nakagomi, T., Aboudy, Y., Silberstein, I., Behar-Novat, E., Nakagomi, O. e Shulman, L.M. (2013). Identification By Full-Genome Analysis Of A Bovine Rotavirus Transmitted Directly To And Causing Diarrhea In A Human Child. *J. Clin. Microbiol.* 51:182-189.
- Domingo, E. e Holland, J.J. (1997). RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu. Rev. Microbiol.* 51:151-178.
- Donato, C.M., Manuelpillai, N.M., Cowley, D., Roczo-Farkas, S., Buttery, J.P., Crawford, N.W. e Kirkwood, C.D.. (2014). Genetic characterization of a novel G3P[14] rotavirus strain causing gastroenteritis in 12 year old Australian child. *Infect. Genet. Evol.* 25:97-109.
- Dóro, R., László, B., Martella, V., Leshem, E., Gentsch, J., Parashar, U. e Bányai, B. (2014). Review of global rotavirus strain prevalence data from six years post vaccine licensure surveillance: is there evidence of strain selection from vaccine pressure? *Infect. Genet. Evol.* 28:446-461.
- Dóro, R., Farkas, S.L., Martella, V. e Bányai, K. (2015). Zoonotic transmission of rotavirus: surveillance and control. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 13:1337-1350.
- Dóro, R., Marton, S., Bartókné, A.H, Lengyel, G., Agócs, Z., Jakab, F. e Bányai, K. (2016). Equine-like G3 rotavirus in Hungary, 2015 - Is it a novel intergenogroup reassortant pandemic strain? *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 63:243-255.
- Ehrenkranz, P., Lanata, C., Penny, M., Salazar-Lindo, E. e Glass, R. (2001). Rotavirus diarrhea disease burden in Peru: the need for a rotavirus vaccine and its potential cost savings. *Rev. Panam. Salud Publica* 10:240–247.
- Esona, M.D., Geyer, A., Banyai, K., Page, N., Aminu, M., Armah, G.E., Hull, J., Steele, D.A., Glass, R.I. e Gentsch, J.R. (2009). Novel human rotavirus genotype G5P[7] from child with diarrhea, Cameroon. *Emerg. Infect. Dis.* 15:83-86.

- Espejo, P.W., Peralta F.O., Pacheres H.C., Valle, L.J., Tapia A.C., Mayra, J.B., Ruiz, J. e Mendoza, J. (2014). Diarrhoea caused by rotavirus in a regional Peruvian hospital: determination of circulating genotypes. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 108:425-430.
- Estes, M.K. e Greenberg, H.B. (2013). Rotaviruses. In: *Fields Virology*, 6th edition, Vol 1, Knipe, D.M., Howley, P.M., Cohen, J.I, Griffin, D.E., Lamb, R.A., Martin, M.A., Racaniello, V.R. e Rizman, B. eds., (Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott, Williams e Wilkins), pp1347-1401.
- EuroRotaNet. Disponível em [http://www.sabin.org/sites/sabin.org/files/jim\\_gray\\_ist.pdf](http://www.sabin.org/sites/sabin.org/files/jim_gray_ist.pdf). Acesso em 13/01/2017.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). (2005). Situación Actual de los Camélidos Sudamericanos em el Perú. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Proyecto de Cooperación Técnica en apoyo a La crianza y aprovechamiento de los Camélidos Sudamericanos en La Región Andina TCP/RLA/2914, 2005. Disponível em <http://www.fao.org/regional/Lamerica/prior/segalim/animal/paises/pdf/2914per.pdf>. Acessado em 13/01/2017.
- Fenaux, M., Cuadras, M.A., Feng, N., Jaimes, M. e Greenberg, H.B. (2006). Extra intestinal spread and replication of a homologous EC rotavirus strain and a heterologous rhesus rotavirus in BALB/c mice. *J. Virol.* 80:5219–5232.
- Feng, N., Franco, M.A. e Greenberg, H.B. (1997). Murine model of rotavirus infection. *Adv. Exp. Med. Biol.* 412:233–240.
- Feng, N., Kim, B., Fenaux, M., Nguyen, H., Vo, P., Omary, M.B. e Greenberg, H.B. (2008). Role of interferon in homologous and heterologous rotavirus infection in the intestines and extra intestinal organs of suckling mice. *J. Virol.* 82:7578–7590.
- Feng, N., Yasukawa, L.L., Sen, A. e Greenberg, H.B. (2013). Permissive replication of homologous murine rotavirus in the mouse intestine is primarily regulated by VP4 and NSP1. *J. Virol.* 87:8307–8316.
- Fenner, F.J., Poul E.G. e Gibbs, J. (1993). *Veterinary Virology*. 2nd ed. San Diego: Academic Press. 615-618.
- Figueroa-Quintanilla, D., Salazar-Lindo, E., Sack, R.B., León-Barúa, R., Sarabia-Arce, S., Campos-Sánchez, M. e Eyzaguirre-Maccan, E. (1993). A controlled trial of bismuth subsalicylate in infants with acute watery diarrheal disease. *N. Engl. J. Med.* 328:1653-1658.
- Fitzgerald, T.A., Munoz, M., Wood, A.R. e Snodgrass, D.R. (1995). Serological and genomic characterisation of group A rotaviruses from lambs. *Arch. Virol.* 140:1541–1548.
- Flewett, T.H., Davies, H., Bryden, A.S. e Robertson, M.J. (1974). Diagnostic electron microscopy of faeces. II. Acute gastroenteritis associated with reovirus-like particles. *J. Clin. Pathol.* 27:608-614.
- Flewett, T.H.; Bryden, A.S. e Davies, H. (1973). Virus particle in gastroenteritis. *Lancet*: 2:1497.
- Franco, M.A. e Greenberg, H.B. (1997). Immunity to rotavirus in T cell deficient mice. *Virology* 238:169–179.
- Franco, M.A., Angel, J. e Greenberg, H.B. (2006). Immunity and correlates of protection for rotavirus vaccines. *Vaccine* 24:2718–2731.
- Galindo-Cardiel, I., Fernández-Jiménez, M., Luján, L., Buesa, J., Espada, J., Fantova, E., Blanco, J., Segalés, J. e Badiola, J.J. (2011). Novel group A rotavirus G8 P[1] as primary cause of an ovine diarrheic syndrome outbreak in weaned lambs. *Vet. Microbiol.* 149:467-471.
- Garaicoechea, L., Olichon, A., Marcoppido, G., Wigdorovitz, A., Mozgovej, M., Saif, L., Surrey, T. e Parreño, V. (2008) Llama-derived single-chain antibody fragments directed to rotavirus VP6 protein possess broad neutralizing activity in vitro and confer protection against diarrhea in mice. *J. Virol.* 82:9753–9764.
- Garmendia, A.E., Lopez, W., Ortega, N. e Chamorro, M.J. (2015). Molecular characterization of rotavirus isolated from alpacas (*Vicugna pacos*) crias with diarrhea in the Andes region of Cusco, Peru. *Vet. Microbiol.* 180:109-112.

- Gauchan, P., Sasaki, E., Nakagomi, T., Do, L.P., Doan, Y.H., Mochizuki, M. e Nakagomi, O. (2015). Whole genotype constellation of prototype feline rotavirus strains FRV-1 and FRV64 and their phylogenetic relationships with feline-like human rotavirus strains. *J. Gen. Virol.* 96:338-350.
- Gazal, S., Mir, I.A., Iqbal, A., Taku, A.K., Kumar, B. e Bhat, M.A. (2011). Ovine rotaviruses. *Open Vet. J.* 1:50-54.
- Gazal, S., Taku, A.K. e Kumar, B. (2012). Predominance of rotavirus genotype G6P[11] in diarrhoeic lambs. *Vet. J.* 193:299-300.
- Gentsch, J.R., Glass, R.I., Woods, P., Gouvea, V., Gorziglia, M., Flores, J., Das, B.K. e Bhan, M.K. (1992). Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 30:1365-1373.
- Gentsch, J.R., Woods, P.A., Ramachandran, M., Das, B.K., Leite, J.P., Alfieri, A., Kumar, R., Bhan, M.K. e Glass RI. (1996). Review of G and P typing results from a global collection of rotavirus strains: implications for vaccine development. *J. Infect. Dis.* 174 Suppl 1:S30-S36.
- 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. e Glass, RI. (2005). Serotype diversity and reassortment between human and animal rotavirus strains: implications for rotavirus vaccine programs. *J. Infect. Dis.* 192 Suppl 1:S146-S159.
- Ghosh, S., Alam, M.M., Ahmed, M.U., Talukdar, R.I., Paul, S.K. e Kobayashi N. (2010). Complete genome constellation of a caprine group A rotavirus strain reveals common evolution with ruminant and human rotavirus strains. *J. Gen. Virol.* 91:2367-2373.
- Ghosh, S., Gatheru, Z., Nyangao, J., Adachi, N., Urushibara, N. e Kobayashi, N. (2011). Full genomic analysis of a simian SA11-like G3P[2] rotavirus strain isolated from an asymptomatic infant: identification of novel VP1, VP6 and NSP4 genotypes. *Infect. Genet. Evol.* 11:57-63.
- Ghosh, S. e Kobayashi, N. (2011). Whole-genomic analysis of rotavirus strains: current status and future prospects. *Future Microbiol.* 6:1049-1065.
- Ghosh, S. e Kobayashi, N. (2014). Exotic rotaviruses in animals and rotaviruses in exotic animals. *Virus Disease.* 25:158-172.
- Gilger, M.A., Matson, D.O., Conner, M.E., Rosenblatt, H.M., Finegold, M.J. e Estes, M.K. (1992). Extra intestinal rotavirus infections in children with immunodeficiency. *J. Pediatr.* 120:912-917.
- Gordon, A.G. (1982). Rotavirus infection and the some syndrome. *J. Infect. Dis.* 146:117-118.
- Gouvea, V., Glass, R.I., Woods, P., Taniguchi, K., Clark, H.F., Forrester, B. e Fang, Z.Y. (1990). Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *J. Clin. Microbiol.* 28:276-282.
- Gouvea, V., de Castro, L., Timenetsky, M.C., Greenberg, H. e Santos, N. (1994). Rotavirus serotype G5 associated with diarrhea in Brazilian children. *J. Clin. Microbiol.* 32:1408-1409.
- Gouvea, V., Santos, N. e Timenetsky M.C. (1994a). Identification of bovine and porcine rotavirus G types by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 32:1338-1340.
- Gouvea, V., Santos, N. e Timenetsky, M.C. (1994b). VP4 typing of bovine and porcine group A rotaviruses by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 32:1333-1337.
- Gouvea, V., Lima, R.C., Linhares, R.E., Clark, H.F., Nosawa, C.M. e Santos, N. (1999). Identification of two lineages (WA-like and F45-like) within the major rotavirus genotype P[8]. *Virus Res.* 59:141-147.
- Graham, A., Kudesia, G., Allen, A.M. e Desselberger, U. (1987). Reassortment of human rotavirus possessing genome rearrangements with bovine rotavirus: evidence for host cell selection. *J. Gen. Virol.* 68:115-122.

Greenberg, B.L., Sack, R.B., Salazar-Lindo, E., Budge, E., Gutierrez, M., Campos, M., Visberg, A., Leon-Barna, R., Vi, A., Maurutia, D., Gomez, M., Lindo, I. e Jaurequi, E. (1991). Measles-associated diarrhea in hospitalized children in Lima, Peru: pathogenic agents and impact on growth. *J. Infect. Dis.* 163:495-502.

Grupo Tematico de Vigilancia de Enfermedades Diarreicas Agudas y Cólera (2011). Direccion general de epidemiologia. Enfermedad Diarreica Aguda (EDA). *Bol. Epidemiol.* 20:928-943.

Gurgel, R.Q., Cuevas, L.E., Vieira, S.C., Barros, V.C., Fontes, P.B., Salustino, E.F., Nakagomi, O., Nakagomi, T., Dove, W., Cunliffe, N. e Hart, C.A. (2007). Predominance of rotavirus P[4]G2 in a vaccinated population, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* 13:1571-1573.

Hagbom, M., Istrate, C., Engblom, D., Karlsson, T., Rodriguez-Diaz, J., Buesa, J., Taylor, J.A., Loitto, V.M., Magnusson, K.E., Ahlman, H., Lundgren, O. e Svensson, L. (2011). Rotavirus stimulates release of serotonin (5-HT) from human enterochromafin cells and activates brain structures involved in nausea and vomiting. *PLoS Pathog.* 7:e1002115.

Hagbom, M., Sharma, S., Lundgren, O. e Svensson, L. (2012). Towards a human rotavirus disease model. *Curr. Opin. Virol.* 2:408-418.

He, B., Yang, F., Yang, W., Zhang, Y., Feng, Y., Zhou, J., Xie, J., Feng, Y., Bao, X., Guo, H., Li, Y., Xia, L., Li, N., Matthijssens, J., Zhang, H. e Tu, C. (2013). Characterization of a novel G3P[3] rotavirus isolated from a lesser horseshoe bat: a distant relative of feline/canine rotaviruses. *J. Virol.*, 87:12357-12366.

Heaton, P. M. e Ciarlet, M. (2007). The pentavalent rotavirus vaccine: discovery to licensure and beyond. *Infect. Clin. Dis.* 45:1618-1624.

Hemming, M., Räsänen, S., Huhti, L., Paloniemi, M., Salminen, M. e Vesikari, T. (2013). Major reduction of rotavirus, but not norovirus, gastroenteritis in children seen in hospital after the introduction of RotaTeq vaccine into the National Immunization Programme in Finland. *Eur. J. Pediatr.* 172:739-746.

Hemming-Harlo, M., Markkula, J., Huhti, L., Salminen, M. e Vesikari, T. (2016). Decrease of Rotavirus Gastroenteritis to a Low Level Without Resurgence for Five Years After Universal RotaTeq Vaccination in Finland. *Pediatr. Infect. Dis J.* 35:1304-1308.

Hertel, P.M., Crawford, S.E., Bessard, B.C. e Estes, M.K. (2013). Prevention of cholestasis in the murine rotavirus-induced biliary atresia model using passive immunization and non-replicating virus-like particles. *Vaccine* 31:5778-5784.

Honma, S., Chizhikov, V., Santos, N., Timenetsky, M.C.S.T., Linhares, A., Ushijima, H., Armah, G., Gentsch, J., Kapikian, A.Z. e Hoshino, Y. (2007). Development and validation of a DNA microarray for genotyping of group A rotavirus VP4 (P[4], P[6], P[8], P[9], and P[14]) and VP7 (G1 to G6, G8 to G10, and G12) genes. *J. Clin. Microbiol.* 45:2641-2648.

Hou, Z., Huang, Y., Huan, Y., Pang, W., Meng, M., Wang, P., Yang, M., Jiang, L., Cao, X. e Wu, K.K. (2008). Anti-NSP4 antibody can block rotavirus-induced diarrhea in mice. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 46:376-385.

Huang, P., Xia, M., Tan, M., Zhong, W., Wei, C., Wang, L., Morrow, A. e Jiang, X. (2012). Spike protein VP8\* of human rotavirus recognizes histo-blood group antigens in a type-specific manner. *J. Virol.* 86:4833-4843.

Hu, L., Crawford, S.E., Czako, R., Cortes-Penfield, N.W., Smith, D.F., Le Pendu, J., Estes, M.K. e Prasad, B.V. (2012). Cell attachment protein VP8\* of a human rotavirus specifically interacts with A-type histo-blood group antigen. *Nature* 485:256-259.

Hwang, K.P., Wu, F.T., Bányai, K., Wu, H.S., Yang, D.C., Huang, Y.C., Lin, J.S., Hsiung, C.A., Huang, J.C., Jiang, B. e Gentsch, J.R. (2012). Identification of porcine rotavirus-like genotype P[6] strains in Taiwanese children. *J. Med. Microbiol.* 61:990-997.

Imbert-Marcille, B.M., Barbé, L., Dupé, M., Le Moullac-Vaidye, B., Besse, B., Peltier, C., Ruvoën-Clouet, N. e Le Pendu, J. (2014). A FUT2 gene common polymorphism determines resistance to rotavirus A of the P [8] genotype. *J. Infect. Dis.* 209:1227-1230.

- Iturriza-Gómara, M., Cubitt, D., Desselberger, U. e Gray, J. (2001). Amino acid substitution within the VP7 protein of G2 rotavirus strains associated with failure to serotype. *J. Clin. Microbiol.* 39:3796-3798.
- Iturriza-Gómara, M., Wong, C., Blome, S., Desselberger, U. e Gray, J. (2002). Molecular Characterization of VP6 genes of human rotavirus isolates: correlation of genogroups with subgroups and evidence of independent segregation. *J. Virol.* 76:6596-6601.
- Iturriza-Gómara, M., Desselberger, U. e Gray, J. (2003). Molecular epidemiology of rotaviruses: genetic mechanisms associated with diversity. In: *Viral Gastroenteritis*, Desselberger, U. e Gray, J., eds. (Amsterdam, Elsevier Science), pp. 317-344.
- Iturriza-Gómara, M., Kang, G. e Gray, J. (2004). Rotavirus genotyping: keeping up with an evolving population of human rotaviruses. *J. Clin. Virol.* 31:259-265.
- Jere, K.C., Esona, M.D., Ali, Y.H., Peenze, I., Roy, S., Bowen, M.D., Saeed, I.K., Khalafalla, A.I., Nyaga, M.M., Mphahlele, J., Steele, D. e Seheri, M.L. (2014). Novel NSP1 genotype characterised in an African camel G8P[11] rotavirus strain. *Infect. Genet. Evol.* 21:58-66.
- Jiang, B., Gentsch, J.R. e Glass, R.I. (2012). The role of serum antibodies in the protection against rotavirus disease: an overview. *Clin. Infect. Dis.* 34:1351-1361.
- Johansson, E., Istrate, C., Charpilienne, A., Cohen, J., Hinkula, J., Poncet, D., Svensson, L. e Johansen, K. (2008). Amount of maternal rotavirus-specific antibodies influence the outcome of rotavirus vaccination of newborn mice with virus-like particles. *Vaccine* 26:778-785.
- Kaminjolo, J.S. e Adesiyun, A.A. (1994). Rotavirus infection in calves, piglets, lambs and goat kids in Trinidad. *Br. Vet. J.* 150:293-239.
- Kang, G. (2013). New-generation treatment? Targeted antiviral therapy for rotavirus. *Gastroenterology* 145:711-714.
- Kapikian, A.Z., Hoshino, Y. e Chanock, R.M. (2001). Rotavirus. In: *Fields Virology*, 4th edition, Vol 1, Fields B.N., Knipe, D.M., Howle, P.M., eds. (Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins), pp. 1787-1834.
- Khamrin, P., Maneekarn, N., Peerakome, S., Malasao, R., Thongprachum, A., Chan-It, W., Mizuguchi, M., Okitsu, S. e Ushijima, H. (2009). Molecular characterization of VP4, VP6, VP7, NSP4, and NSP5/6 genes identifies an unusual G3P[10] human rotavirus strain. *J. Med. Virol.* 81:176-182.
- Khamrin, P., Maneekarn, N., Peerakome, S., Yagyu, F., Okitsu, S. e Ushijima, H. (2006). Molecular characterization of a rare G3P[3] human rotavirus reassortant strain reveals evidence for multiple human-animal interspecies transmissions. *J. Med. Virol.* 78:986-994.
- Kindler, E., Trojnar, E., Heckel, G., Otto, P.H. e Johne, R. (2013). Analysis of rotavirus species diversity and evolution including the newly determined full-length genome sequences of rotavirus F and G. *Infect. Genet. Evol.* 14:58-67.
- Kirkwood, C., Gentsch, J. e Glass, R. (1999). Sequence analysis of the NSP4 gene from human rotavirus strains isolated in the United States. *Virus Genes* 19:113-122.
- Kudo, S., Zhou, Y., Cao, X.R., Yamanishi, S., Nakata, S. e Ushijima, H. (2001). Molecular characterization in the VP7, VP4 and NSP4 genes of human Rotavirus serotype 4 (G4) isolated in Japan and Kenya. *Microbiol. Immunol.* 45:167-171.
- Kumar, S., Stecher, G. e Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33, 1870-1874.
- Lee, J.B., Youn, S.J., Nakagomi, T., Park, S.Y., Kim, T.J., Song, C.S., Jang, H.K., Kim, B.S. e Nakagomi, O. (2003). Isolation, serologic and molecular characterization of the first G3 caprine rotavirus. *Arch. Virol.* 148:643-657.



- Leite, J.P., Alfieri, A.A. e Woods, P. (1996). Rotavirus G and P types circulating in Brazil: characterization by RT-PCR, probe hybridization, and sequence analysis. *Arch. Virol.* 141:2365-2374.
- Liu, Y., Huang, P., Tan, M., Liu, Y., Biesiada, J., Meller, J., Castello, A.A., Jiang, B. e Jiang, X. (2012). Rotavirus VP8\*: phylogeny, host range, and interaction with histoblood group antigens. *J. Virol.* 86:9899-9910.
- López, W.P., Chamorro, M.L. e Garmendia, A.E.B. (2011) Detección rápida de rotavirus y coronavirus en crías de Alpaca (*Vicugna pacos*) con diarrea en la región del Cusco, Perú [Rapid detection of rotavirus and coronavirus in alpaca crias (*Vicugna Pacos*) with diarrhea in the Cusco region, Peru]. *Rev. Inv. Vet. Perú* 22:407-411.
- Luchs, A., Madalosso, G., Cilli, A., Morillo, S.G., Martins, S.R., de Souza, K.A., Namiyama, G.M., Gonçalves, C.R., Carmona, R.C. e Timenetsky, M. (2016). Outbreak of G2P[4] rotavirus gastroenteritis in a retirement community, Brazil, 2015: An important public health risk? *Geriatr. Nurs.* pii: S0197-4572(16)30238-5.
- Luna P.M. (2008). Vigilancia epidemiológica de diarreas y vigilancia de rotavirus basada en sitios centinela 2008 [Epidemiological surveillance of rotavirus diarrhea and surveillance based on sentinel sites 2008]. Lima, Perú: Dirección General de Epidemiología (DGE). Disponível em <http://www.sabin.org/files/miguelangel.co.pdf>. Acessado em 13/01/2017.
- Maes, P., Matthijnssens, J., Rahman, M. e Van Ranst, M. (2009). RotaC: a web-based tool for the complete genome classification of group A rotaviruses. *BMC Microbiol.* 9:238.
- Malherbe, H.H. e Strickland-Chomley, M. (1967). Simian virus SA11 and the related 'O' agent. *Arch. Gesamte. Virusforsch* 22:235–245.
- Marcoppido, G., Parreño, V. e Vilá, B. (2010). Antibodies to pathogenic livestock viruses in a wild vicuña (*Vicugna vicugna*) population in the Argentinean Andean altiplano. *J. Wildl. Dis.* 46:608-614.
- Marín, R.E. (2009). Prevalencia Sanitaria en llamas (lama glama) de la provincia de Jujuy, Argentina. Proyecto FAO n° 2552/7, 2009. [www.produccion-animal.com.ar](http://www.produccion-animal.com.ar). Acesso em 20 de outubro de 2011.
- Markkula, J., Hemming-Harlow, M., Salminen, M.T., Savolainen-Kopra, C., Pirhonen, J., Al-Hello, H. e Vesikari, T. (2017). Rotavirus epidemiology 5-6 years after universal rotavirus vaccination: persistent rotavirus activity in older children and elderly. *Infect. Dis. (Lond).* 9:1-8.
- Martella, V., Bányai, K., Matthijnssens, J., Buonavoglia, C. e Ciarlet, M. (2010). Zoonotic aspects of rotaviruses. *Vet Microbiol.* 140:246–255.
- 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. e Ranst, M. (2008a). Full genome-based classification of rotaviruses reveals a common origin between human Wa-Like and porcine rotavirus strains and human DS-1-like and bovine rotavirus strains. *J. Virol.* 82:3204–3219.
- Matthijnssens, J., Ciarlet, M., Rahman, M., Attoui, H., Bányai, K., Estes, M., Gentsch, J., Iturriza-Gómara, M., Kirkwood, C., Martella, V., Mertens, P.P., Nakagomi, O., Patton, J.T., Ruggeri, F.M., Saif, L.J., Santos, N., Steyer, A., Taniguchi, K., Desselberger, U. e Ranst, M.V. (2008b). Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. *Arch. Virol.* 153:1621-1629.
- Matthijnssens, J., Bilcke, J., Ciarlet, M., Martella, V., Bányai, K., Rahman, M., Zeller, M., Beutels, P., van Damme, P. e Van Ranst M. (2009a). Rotavirus disease and vaccination: impact on genotype diversity. *Future Microbiol.* 4:1303-1316.
- Matthijnssens, J., Potgieter, C.A., Ciarlet, M., Parreño, V., Martella, V., Bányai, K., Garaicoechea, L., Palombo, E.A., Novo, L., Zeller, M., Arista, S., Gerna, G., Rahman, M. e Ranst, M. (2009b). Are human P[14] rotavirus strains the result of interspecies transmissions from sheep or other ungulates that belong to the mammalian order Artiodactyla? *J. Virol.* 83:2917–2929.

- Matthijnssens, J., Heylen, E., Zeller, M., Rahman, M., Lemey, P. e van Ranst M. (2010a). Phylodynamic analyses of rotavirus genotypes G9 and G12 underscore their potential for swift global spread. *Mol Biol Evol.* 27:2431-2436.
- Matthijnssens, J., Martella, V. e van Ranst, M. (2010). Genomic evolution, host-species barrier, reassortment and classification of rotaviruses. *Future Virol.* 5:385–390.
- Matthijnssens, J., Taraporewala, Z.F., Yang, H., Rao, S., Yuan, L., Cao, D., Hoshino, Y., Mertens, P.P., Carner, G.R., Mcneal, M., Sestak, K., van Ranst, M. e Patton, J.T. (2010b). Simian rotaviruses possess divergent gene constellations that originated from interspecies transmission and reassortment. *J Virol.* 84:2013–2026.
- Matthijnssens, J., Attoui, H., Bányai, K., Brister, J.R., Buesa, J., Ciarlet, M., Desselberger, U., Esona, M.D., Estes, M.K., Gentsch, J.R., Iturriza-Gómara, M., Johne, R., Kirkwood, C., Martella, V., McDonald, S.M., Mertens, P.P., Nakagomi, O., Parreño, V., Patton, J.T., Rahman, M., Ruggeri, F.M., Saif, L.J., Santos, N., Steyer, A., Taniguchi, K. e Ranst, M. (2011a). Uniformity of Rotavirus Strain Nomenclature Proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). *Arch. Virol.* 156:1397-1413.
- Matthijnssens, J., de Grazia, S., Piessens, J., Heylen, E., Zeller, M., Giammanco, G.M., Bányai, K., Buonavoglia, C., Ciarlet, M., Martella, V. e van Ranst M. (2011b). Multiple reassortment and interspecies transmission events contribute to the diversity of feline, canine and feline/canine like human group A rotavirus strains. *Infect Genet Evol.* 11(6):1396-406.
- Matthijnssens, J. e van Ranst, M. (2012). Genotype constellation and evolution of group A rotaviruses infecting humans. *Curr Opin Virol.* 2:426–433.
- Matthijnssens, J., Otto, P.H., Ciarlet, M., Desselberger, U., Van Ranst, M. e Johne, R. (2012). VP6-sequence-based cutoff values as a criterion for rotavirus species demarcation. *Arch. Virol.* 157:1177–1182.
- Marton, S., Dóró, R., Fehér, E., Forró, B., Ihász, K., Varga-Kugler, R., Farkas, S.L. e Bányai, K. (2017). Whole genome sequencing of a rare rotavirus from archived stool sample demonstrates independent zoonotic origin of human G8P[14] strains in Hungary. *Virus Res.* 227:96-103.
- Mebus, C.A., Underdahl, N.R., Rhodes, M.B. e Twiehaus, M.J. (1969). Calf diarrhea (scours): reproduced with a virus from a field outbreak. *Univ. Nebraska Res. Bull.* 233:1–16.
- Mendez, E., Arias, C.F. e Lopez, S. (1993). Binding to sialic acids is not an essential step for the entry of animal rotaviruses to epithelial cells in culture. *J. Virol.* 67:5253-5259.
- Mijatovic-Rustempasic, S., Roy, S., Sturgeon, M., Rungtsuriyachai, K., Reisdorf, E., Cortese, M.M. e Bowen, M.D. (2015). Full-Genome Sequence of the First G8P[14] Rotavirus Strain Detected in the United States. *Genome Announc.* 3pii: e00677-15.
- Mihalov-Kovács, E., Gellért, Á., Marton, S., Farkas, S.L., Fehér, E., Oldal, M., Jakab, F., Martella, V., Bányai, K. (2015). Candidate new rotavirus species in sheltered dogs, Hungary. *Emerg. Infect. Dis.* 21:660-663.
- Miño, S., Matthijnssens, J., Badaracco, A., Garaicoechea, L., Zeller, M., Heylen, E., van Ranst, M., Barrandeguy, M. e Parreño, V. (2013). Equine G3P[3] rotavirus strain E3198 related to simian RRV and feline/canine-like rotaviruses based on complete genome analyses. *Vet. Microbiol.* 161:239-246.
- Morales, S., Paredes, D. e Pezo, D. (2007) Asociación de rotavirus y Escherichia coli fimbriada como agentes causales de infecciones entéricas en alpacas neonatas [Association between fimbriated Escherichia coli and rotavirus as causative agents of enteric infections in newborn alpacas]. *Rev. Inv. Vet. Perú* 18:150-153.
- Mukherjee, A., Mullick, S., Kobayashi, N. e Chawla-Sarkar, M. (2012). The first identification of rare human group A rotavirus strain G3P[10] with severe infantile diarrhea in eastern India. *Infect. Genet. Evol.* 12:1933-1937.
- Muñoz, M., Alvarez, M., Lanza, I. e Cármenes P. (1996). Role of enteric pathogens in the aetiology of neonatal diarrhoea in lambs and goat kids in Spain. *Epidemiol. Infect.* 117:203–211.

- Nakagomi, T. e Nakagomi, O. (1989). RNA-RNA hybridization identifies a human rotavirus that is genetically related to feline rotavirus. *J. Virol.* 63:1431-1434.
- Nakagomi, T. e; Nakagomi, O. (2000). Human rotavirus HCR3 possesses a genomic RNA constellation indistinguishable from that of feline and canine rotaviruses. *Arch. Virol.* 145:2403-2409
- Nahum, L.A., Ruiz, J.C. (2015) Filogenômica. In: Ciências Genômicas: Fundamentos e Aplicações, 1a Ed., 117 – 142. Editado por Moreira, L.M. Sociedade Brasileira de Genética, São Paulo, Brasil.
- Ndze, V.N., Achidi, E.A. e Papp, H. (2013). Shared G12 VP7 gene among human and bovine rotaviruses detected in Cameroonian villages. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 60:21-28.
- Ndze, V.N., Esona, M.D., Achidi, E.A., Gonsu, K.H., Dóró, R., Marton, S., Farkas, S., Ngeng, M.B., Ngu, A.F., Obama-Abena, M.T. e Bányai, K. (2014). Full genome characterization of human rotavirus A strains isolated in Cameroon, 2010-2011: diverse combinations of the G and P genes and lack of reassortment of the backbone genes. *Infect. Genet. Evol.* 28:537-560.
- Offit, P.A. (1994). Rotaviruses: immunological determinants of protection against infection and disease. *Adv. Virus Res.* 44:161–202.
- Otto, P.H., Ahmed, M.U., Hotzel, H., Machnowska, P., Reetz, J., Roth, B., Trojnar, E. e Johne, R. (2012). Detection of avian rotaviruses of groups A, D, F and G in diseased chickens and turkeys from Europe and Bangladesh. *Vet. Microbiol.* 156:8-15.
- Palombo, E.A., Bugg, H.C., Masendycz, P.J. e Bishop, R.F. (1997). Sequence of the VP7 gene of an atypical human rotavirus: evidence for genetic and antigenic drift. *DNA Seq.* 7: 307-311.
- Papp, H., Al-Mutairi, L.Z., Chehadah, W., Farkas, S.L., Lengyel, G., Jakab, F., Martella, V., Szűcs, G. e Bányai, K. (2012). Novel NSP4 genotype in a camel G10P[15] rotavirus strain. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 59:411-421.
- Papp, H., Borzák, R., Farkas, S., Kisfali, P., Lengyel, G., Molnár, P., Melegh, B., Matthijnsens, J., Jakab, F., Martella, V. e Bányai, K. (2013a). Zoonotic transmission of reassortant porcine G4P[6] rotaviruses in Hungarian pediatric patients identified sporadically over a 15 year period. *Infect. Genet. Evol.* 19:71-80.
- Papp, H., László, B., Jakab, F., Ganesh, B., De Grazia, S., Matthijnsens, J., Ciarlet, M., Martella, V. e Bányai, K. (2013b). Review of group A rotavirus strains reported in swine and cattle. *Vet. Microbiol.* 165:190-199.
- Papp, H., Matthijnsens, J., Martella, V., Ciarlet, M. e Bányai, K. (2013c). Global distribution of group A rotavirus strains in horses: a systematic review. *Vaccine* 31:5627-5633.
- Papp, H., Malik, Y.S., Farkas, S.L., Jakab, F., Martella, V. e Bányai, K. (2014). Rotavirus strains in neglected animal species including lambs, goats and camelids. *Virusdisease* 25:215-222.
- Papp, H., Mihalov-Kovács, E., Dóró, R., Marton, S., Farkas, S.L., Giammanco, G.M., de Grazia, S., Martella, V. e Bányai, K. (2015). Full-genome sequencing of a Hungarian canine G3P[3] Rotavirus A strain reveals high genetic relatedness with a historic Italian human strain. *Virus Genes* 50:310-315.
- Parashar, U.D., Hummelman, E.G., Bresee, J.S., Miller, M.A. e Glass, R.I. (2003). Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerg. Infect. Dis.* 9:565-572.
- Parashar, U.D., Burton, A., Lanata, C., Boschi-Pinto, C., Shibuya, K., Steele, D., Birmingham, M. e Glass, R.I. (2009). Global mortality associated with rotavirus disease among children in 2004. *J. Infect. Dis.* 200:9-15.
- Parra, M., Herrera, D., Calvo-Calle, J.M., Stern, L.J., Parra-López, C.A., Butcher, E., Franco, M. e Angel, J. (2014). Circulating human rotavirus specific CD4 T cells identified with a class II tetramer express the intestinal homing receptors  $\alpha 4\beta 7$  and CCR9. *Virology* 452–453:191–201.

Parreño, V., Constantini, V., Cheetham, S., Blanco Viera, J., Saif, L.J., Fernández, F., Leoni, L. e Schudel, A. (2001). First isolation of rotavirus associated with neonatal diarrhoea in guanacos (*Lama guanicoe*) in the Argentinean Patagonia region. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* 48:713-720.

Patel, M.M., Pitzer, V.E., Alonso, W.J., Vera, D., Lopman, B., Tate, J., Viboud, C. e Parashar UD. (2013). Global seasonality of rotavirus disease. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 32:e134-47.

Patton, J.T., Taraporelawa, Z., Chen, D., Chizhikov, V., Jones, M., Elhelu, A., Collins, M., Kearney, K., Wagner, M., Hoshino, Y. e Gouvea, V. (2001). Effect of intragenic rearrangement and changes in the 3' consensus sequence on NSP1 expression and rotavirus replication. *J. Virol.* 75:2076-2086.

Payne, D.C., Boom, J.A., Staat, M.A., Edwards, K.M., Szilagyi, P.G., Klein, E.J., Selvarangan, R., Azimi, P.H., Harrison, C., Moffatt, M., Johnston, S.H., Sahni, L.C., Baker, C.J., Rench, M.A., Donauer, S., McNeal, M., Chappell, J., Weinberg, G.A., Tasslimi, A., Tate, J.E., Wikswow, M., Curns, A.T., Sulemana, I., Mijatovic-Rustempasic, S., Esona, M.D., Bowen, M.D., Gentsch, J.R. e Parashar, U.D. (2013). Effectiveness of pentavalent and monovalent rotavirus vaccines in concurrent use among US children <5 years of age, 2009-2011. *Clin. Infect. Dis.* 57:13-20.

Payne, D.C., Selvarangan, R., Azimi, P.H., Boom, J.A., Englund, J.A., Staat, M.A., Halasa, N.B., Weinberg, G.A., Szilagyi, P.G., Chappell, J., McNeal, M., Kleinm E.J., Sahni, L.C., Johnston, S.H., Harrison, C.J., Baker, C.J., Bernstein, D.I., Moffatt, M.E., Tate, J.E., Mijatovic-Rustempasic, S., Esona, M.D., Wikswow, M.E., Curns, A.T., Sulemana, I., Bowen, M.D., Gentsch, J.R. e Parashar, U.D. (2015). Long-term Consistency in Rotavirus Vaccine Protection: RV5 and RV1 Vaccine Effectiveness in US Children, 2012-2013. *Clin. Infect. Dis.* 61:1792–1799.

Phan, M.V.T., Anh, P.H., van Cuong, N., Munnink, B.B.O., van der Hoek, L., My, P.T., Tri, T.N., Bryant, J.E., Baker, S., Thwaites, G., Woolhouse, M., Kellam, P., Rabaa, M. A. e Cotton, M. L. (2016). Unbiased whole-genome deep sequencing of human and porcine stool samples reveals circulation of multiple groups of rotaviruses and a putative zoonotic infection. *bioRxiv* 058875; doi: <https://doi.org/10.1101/058875>.

Quaye, O., McDonald, S., Esona, M.D., Lyde, F.C., Mijatovic-Rustempasic, S., Roy, S., Banegas, D.J., Quiñonez, Y.M., Chinchilla, B.L., Santiago, F.G., Lozano, H.G., Rey-Benito, G., de Oliveira, L.H., Gentsch, J.R. e Bowen, M.D. (2013). Rotavirus G9P[4] in 3 countries in Latin America, 2009-2010. *Emerg. Infect. Dis.* 19:1332-1333.

Ramani, S., Paul, A., Saravanabavan, A., Menon, V.K., Arumugam, R., Sowmya-Narayanan, T.V., Samuel, P. e Kang, G. (2010). Rotavirus antigenemia in Indian children with rotavirus gastroenteritis and asymptomatic infections. *Clin. Infect. Dis.* 51:1284–1289.

Ramig, R.F. (1997). Genetics of the rotaviruses. *Annu. Rev. Microbiol.* 51:225-255.

Ramig, R.F. (2007). Systemic rotavirus infection. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 5:591–612.

RCWG: Rotavirus Classification Working Group: (2016). Newly assigned genotypes. Disponível em <https://rega.kuleuven.be/cev/viralmetagénomics/virus-classification/rcwg> . Acesso em 12/01/2017.

Rivera, H., Madewell, B.R. e Ameghino, E. (1987). Serologic survey of viral antibodies in the Peruvian alpaca (*Lama pacos*). *Am. J. Vet. Res.* 48:189-191.

Rojas, M.A. (2013). Detecção e genotipagem de cepas de rotavírus associadas à diarreia em alpacas neonatas (Vicugna pacos) na serra sul do Peru. Tese para obter o grau de mestrado do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio Janeiro, RJ-Brasil.

Sá, A.C., Gómez, M.M., Lima, I.F., Quetz, J.S., Havt, A., Oriá, R.B., Lima, A.A. e Leite, J.P. (2015). Group a rotavirus and norovirus genotypes circulating in the northeastern Brazil in the post-monovalent vaccination era. *J. Med. Virol.* 87:1480-1490.

Santos, N. e Hoshino, Y. (2005). Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *Rev. Med. Virol.* 15:29–56.

- Santos, N., Volotão, E.M., Soares, C.C., Albuquerque, M.C., da Silva, F.M., Chizhikov, V. e Hoshino, Y. (2003). VP7 gene polymorphism of serotype G9 rotavirus strains and its impact on G genotype determination by PCR. *Virus Res.* 93:127-138.
- Santos, N., Honma, S., Timenestsky, M., Linares, A., Ushijima H., Armah, G., Gentsh, J. e Hoshino, Y. (2008). Development of a microliter plate hybridization based PCR-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for identification of clinically relevant human group A rotavirus G and P genotypes. *J. Clin. Microbiol.* 46:462-469.
- Santos, N.S.O. e Soares, C.C. (2015). *Viroses Entéricas*. In: *Virologia humana*, 3ª edição., Santos, N.S.O., Romanos, M.T.V. e Wigg, M.D. eds. (Rio de Janeiro, Guanabara Koogan), pp.190-231.
- Sapparapu, G., Sims, A.L., Aiyegbo, M.S., Shaikh, F.Y., Harth, E.M. e Crowe Jr., J.E. (2014). Intracellular neutralization of a virus using a cell-penetrating molecular transporter. *Nanomedicine (Lond).* 9:1613-1624.
- Sarker, S.A., Jäkel, M., Sultana, S., Alam, N.H., Bardhan, P.K., Chisti, M.J., Salam, M.A., Theis, W., Hammarström, L. e Frenken, L. G. (2013). Anti-rotavirus protein reduces stool output in infants with diarrhea: a randomized placebo-controlled trial. *Gastroenterology* 145:740–748.e8.
- Sattar, S.A., Jacobsen, H., Rahman, H., Cusack, T.M. e Rubino, J.R. (1994). Interruption of rotavirus spread through chemical disinfection. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* 15::751–756.
- Schwartz-Cornil, I., Benureau, Y., Greenberg, H., Hendrickson, B.A. e Cohen, J. (2002). Heterologous protection induced by the inner capsid proteins of rotavirus requires transcytosis of mucosal immunoglobulins. *J. Virol.* 76:8110–8117.
- Shen, S., Burke, B. e Desselberger, U. (1993). Nucleotide sequences of the VP4 and VP7 genes of a Chinese lamb rotavirus: evidence for a new P type in a G10 type virus. *Virology* 197:497–500.
- Shen, S., Burke, B. e Desselberger, U. (1994). Rearrangement of the VP6 gene of a group A rotavirus in combination with a point mutation affecting trimer stability. *J. Virol.* 68:1682–1688.
- Silvetri, L.S., Taraporewala, Z.F. e Patton, J.T. (2004). Rotavirus replication: plus-sense templates for double-stranded RNA synthesis are made in viroplasm. *J. Virol.* 78:7763-7774.
- Solberg, O.D., Hasing, M.E., Trueba, G. Eisenberg, J.N. (2009). Characterization of novel VP7, VP4, and VP6 genotypes of a previously untypeable group A rotavirus. *Virology* 385:58-67.
- Tam, K.I., Roy, S., Esona, M.D., Jones, S., Sobers, S., Morris-Glasgow, V., Rey-Benito, G., Gentsch, J.R. e Bowen, M.D.. (2014). Full genomic characterization of a novel genotype combination, G4P[14], of a human rotavirus strain from Barbados. *Infect. Genet. Evol.* 28:524-529.
- Tate, J.E., Burton, A.H., Boschi-Pinto, C., Steele, A.D., Duque, J., Parashar, U.D. e WHO-coordinated Global Rotavirus Surveillance Network. (2012). 2008 estimate of worldwide rotavirus-associated mortality in children younger than 5 years before the introduction of universal rotavirus vaccination programmes: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect. Dis.* 12:136-141.
- Teodoroff, T.A., Tsunemitsu, H., Okamoto, K., Katsuda, K., Kohmoto, M., Kawashima, K., Nakagomi, T. e Nakagomi, O. (2005). Predominance of porcine rotavirus G9 in Japanese piglets with diarrhea: close relationship of their VP7 genes with those of recent human G9 strains. *J. Clin. Microbiol.* 43:1377-1384.
- Tokuhara, D., Álvarez, B., Mejima, M., Hiroiwa, T., Takahashi, Y., Kurokawa, S., Kuroda, M., Oyama, M., Kozuka-Hata, H., Nochi, T., Sagara, H., Aladin, F., Marcotte, H., Frenken, L.G., Iturriza-Gómara, M., Kiyono, H., Hammarström, L. e Yuki, Y. (2013). Rice-based oral antibody fragment prophylaxis and therapy against rotavirus infection. *J. Clin. Invest.* 123:3829–3838.
- Trojnar, E., Otto, P. e Johne, R. (2009). The first complete genome sequence of a chicken group A rotavirus indicates independent evolution of mammalian and avian strains. *Virology* 386:325-333.

- Trojnar, E., Sachsenröder, J., Twardziok, S., Reetz, J., Otto, P.H. e Johne, R. (2012). Identification of an avian group A rotavirus containing a novel VP4 gene with a close relationship to those of mammalian rotaviruses. *J. Gen. Virol.* 94:136-142.
- Vega, C.G., Bok, M., Vlasova, A.N., Chattha, K.S., Gómez-Sebastián, S., Nuñez, C., Alvarado, C., Lasa, R., Escribano, J.M., Garaicoechea, L.L., Fernandez, F., Bok, K., Wigdorovitz, A., Saif, L.J. e Parreño, V. (2013). Recombinant monovalent llama-derived antibody fragments (VHH) to rotavirus VP6 protect neonatal gnotobiotic piglets against human rotavirus-induced diarrhea. *PLoS Pathog.* 9:e1003334.
- Velázquez, .RF., Linhares, A.C., Muñoz, S., Seron, P., Lorca, P., De Antonio, R. e Ortega-Barria, E. (2017). Efficacy, safety and effectiveness of licensed rotavirus vaccines: a systematic review and meta-analysis for Latin America and the Caribbean. *BMC Pediatr.* 17:14.
- Vende, P., Prion, M., Castagné, N. e Poncet, D. (2000). Efficient translation of rotavirus mRNA requires simultaneous interaction of NSP3 with the eukaryotic initiation factor eIF4G and the mRNA 3' end. *J. Virol.* 74:7064-7071.
- Vesikari, T., Matson, D., Dennehy, P., van Damme, P., Santosham, M., Rodriguez, Z., Dallas, M., Heyse, J., Gouveia, M.G., Black, S., Shinefield, H., Christie, C., Ylitalo, S., Itzler, R., Coia, M.L., Onorato, M., Adeyi, B., Marshall, G., Gothefors, L., Campens, D., Karvonen, A., Watt, J., O'Brien, K., Dinubile, M., Clark, H.F., Boslego, J., Offit, P.A. e Heaton, P.M. (2006). Safety and efficacy of a pentavalent human-bovine (WC3) reassortant rotavirus vaccine. *N. Engl. J. Med.* 354:23–33.
- Walsh, D.A., Sharma, A.K. (2009) *Molecular Phylogenetics: Testing Evolutionary Hypotheses*. In: *Bacteriophages, Methods and Protocols*. 1<sup>st</sup> edition, 131 – 170. Edited by Clokie, M.R.J., Kropinski, A.M. Humana Press, New York, USA.
- Wani, S.A., Bhat, M.A. e Ishaq, S.M. (2007). Molecular epidemiology of rotavirus in calves and lambs with diarrhoea in Kashmir valley. *Indian J. Virol.* 18:17–19.
- Wani, S.A., Bhat, M.A., Nawchoo, R., Munshi, Z.H. e Bach, A.S. (2004). Evidence of rotavirus associated with neonatal lamb diarrhoea in India. *Trop. Anim. Health Prod.* 36:27-32.
- Ward, L.A., Rosen, B.I., Yuan, L. e Saif, L.J. (1996). Pathogenesis of an attenuated and avirulent strain of group A human rotavirus in neonatal gnotobiotic pigs. *J. Gen. Virol.* 77:1431–1441.
- Ward, R. L., Bernstein, D.I., Young, E.C., Sherwood, J.R., Knowlton, D.R. e Chiff, G.M. (1986). Human rotavirus studies in volunteers: determination of infectious dose and serological response to infection. *J. Infect. Dis.* 154:871-880.
- Ward, R.L., McNeal, M.M. e Steele, A.D. (2008). Why does the world need another rotavirus vaccine? *Ther. Clin. Risk Manag.* 4:49-63.
- Xia, L., Fan, Q., He, B., Xu, L., Zhang, F., Hu, T., Wang, Y., Li, N., Qiu, W., Zheng, Y., Matthijssens, J. e Tu, C. (2014). The complete genome sequence of a G3P[10] Chinese bat rotavirus suggests multiple bat rotavirus inter-host species transmission events. *Infect. Genet. Evol.* 28:1-4.
- Xu, Z., Tuo, W., Clark, K.I. e Woode, G.N. (1996). A major rearrangement of the VP6 gene of a strain of rotavirus provides replication. *Vet. Microbiol.* 52:235-247.
- Yuan, L. e Saif, L.J. (2002). Induction of mucosal immune responses and protection against enteric viruses: rotavirus infection of gnotobiotic pigs as a model. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 87:147–160.
- Yodmeeklin, A., Khamrin, P., Chuchaona, W., Kumthip, K., Kongkaew, A., Vachirachewin, R., Okitsu, S., Ushijima, H. e Maneekarn, N. (2017). Analysis of complete genome sequences of G9P[19] rotavirus strains from human and piglet with diarrhea provides evidence for whole-genome interspecies transmission of nonreassorted porcine rotavirus. *Infect. Genet. Evol.* 47:99-108.

Zeller, M., Heylen, E., De Coster, S., van Ranst, M. e Matthijnsens, J. (2012). Full genome characterization of a porcine-like human G9P[6] rotavirus strain isolated from an infant in Belgium. *Infect. Genet. Evol.* 12:1492-1500.

Zhang, Z., Jia, Z.J., Xiao, F., Ye, R.F., Zhao, J., Liu, J.L. e Yang, J.H. (2011). Full genomic analysis of lamb rotavirus strain Lamb-cc (GenBank record). Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/HQ834204.1>. Acesso em 18/01/2017.

## **9. Material Suplementar**



**Quadro S1.** Iniciadores que foram utilizados nas reações de RT-PCR e (*semi*)*nested* PCR para detecção dos genes VP6, NSP4 e NSP5 dos RVA.

Iniciador	Sentido	Sequência 5'→3'	Posição (nt) <sup>1</sup>	Tamanho do fragmento (pb) <sup>2</sup>	Referência
<b><u>VP6</u></b>					
<b>VP6-Fdeg</b>	Senso	CTACDTGGTATTTYAAAYCCAGT	757 - 778	370	Este estudo
<b>VP6-R</b>	Antissenso	GTCCAATTCATNCCTGGTGG	1106 - 1126		
<b>VP6-F1deg-seminested</b>	Senso	TKAGACCACCAAAYATGACRCCMG	907 - 930	220	Este estudo
<b>VP6-R</b>	Antissenso	GTCCAATTCATNCCTGGTGG	1106 - 1126		
<b><u>NSP4</u></b>					
<b>NSP4-1a</b>	Senso	GCCTTTTAAAAGTTCTGTTCGG	1 - 22	750	Kudo <i>et al.</i> , 2001
<b>NSP4-2b</b>	Antissenso	GGTCACATTAAGACCGTTCC	731 - 750		
<b>NSP4-FM-seminested</b>	Senso	GAGAGAGCGCGTGCGGAAAGATGG	22 - 45	729	Este estudo
<b>NSP4-2b</b>	Antissenso	GGTCACATTAAGACCGTTCC	731-750		
<b><u>NSP5</u></b>					
<b>GEN_NS5F</b>	Senso	GGCTTTTAAAGCGCTACAG	1-19	667	Matthijnsens <i>et al.</i> , 2008a
<b>GEN_NS5R</b>	Antissenso	CCTGTTCTTTATAACCAGCC	651-667		
<b>MAX_1FM-nested</b>	Senso	GGTAACTAGACCAGTTGACG	95 - 121	562	Este estudo
<b>MAX_4RM-nested</b>	Antissenso	GTGGGGAGCTCCCTAGT	637 - 656		

Oligonucleotídeos degenerados; R= A/G, K= G/T, Y= C/T, M= A/C, D = A/G/T, N = aNy base; <sup>1</sup> nt = nucleotídeo; <sup>2</sup> pb = pares de base.

**Quadro S2.** Ciclos da PCR e (semi)*nested* PCR que foram aplicados para cada gene pesquisado.

Gene	Ciclo	
	RT-PCR	(Semi) <i>nested</i> PCR
VP6	95°C/3 min	94°C/3 min
	94°C/40 segundos 40°C/1min 72°C/1min 20 segundos	94°C/40 segundos 45°C/1min 72°C/1 min
	} x 40	} x 35
	72°C/10 min	72°C/10 min
NSP4	95°C/10 min	95°C/10min
	94°C/1 min 40°C/1 min 72°C/1 min 40 segundos	94°C/1 min 50°C/1 min 72°C/1 min 40 segundos
	} x 40	} x 35
	72°C/10 min	72°C/10 min
NSP5	95°C/10 min	95°C/10 min
	94°C/1 min 50°C/1 min 72°C/1 min 40 segundos	94°C/1 min 54°C/1 min 72°C/1 min 30 segundos
	} x 40	} x 35
	72°C/10 min	72°C/10 min

**Quadro S3.** Iniciadores que foram utilizados nas reações de RT-PCR e *seminested* PCR para sequenciamento dos genótipos G (VP7), P (VP4) e I (VP6).

Iniciador	Sentido	Sequência 5'→3'	Posição (nt) <sup>1</sup>	Tamanho do fragmento (pb) <sup>2</sup>	Referência
<b><u>VP7</u></b>					
<b>sBeg9</b>	Senso	GGCTTTAAAAGAGAGAATTTC	1-21	1062	Gouvea <i>et al.</i> , 1990
<b>End9</b>	Antissenso	GGTCACATCATAACAATTCTAATCTAAG	1036 - 1062		
<b>sBeg9</b>	Senso	GGCTTTAAAAGAGAGAATTTC	1-21	941	Gouvea <i>et al.</i> , 1990
<b>G922-seminested</b>	Antissenso	GTRTARAAIACTTGCCACCA	922 - 941		
<b><u>VP4</u></b>					
<b>CON3</b>	Senso	TGGCTTCGCTCATTATAGACA	11 - 31	1457	Gentsch <i>et al.</i> , 1992
<b>C8</b>	Antissenso	ATTGGIGTYTGATAITCRT	1446 - 1467		
<b>CON3</b>	Senso	TGGCTTCGCTCATTATAGACA	11 - 31	877	Gentsch <i>et al.</i> , 1992
<b>CON2-seminested</b>	Antissenso	ATTTCGGACCATTATAACC	868 - 887		
<b><u>VP6</u></b>					
<b>GEN_VP6F</b>	Senso	GGCTTTWAAACGAAGTCTTC	1 - 20	1356	Matthijnsens <i>et al.</i> , 2008a
<b>GEN_VP6R</b>	Antissenso	GGTCACATCCTCTCACT	1340 - 1356		
<b>GEN_VP6F</b>	Senso	GGCTTTWAAACGAAGTCTTC	1 - 20	1126	Matthijnsens <i>et al.</i> , 2008a
<b>VP6.R-seminested</b>	Antissenso	GTCCAATTCATNCCTGGTGG	1106 - 1126		

Oligonucleotídeos degenerados; R= A/G, W= A/T, Y= C/T, I = Inosine aNy base; <sup>1</sup> nt = nucleotídeo; <sup>2</sup> pb = pares de base.

**Quadro S4.** Ciclos utilizados para a genotipagem dos genes VP7, VP4 e VP6 por sequenciamento das estirpes de RVA nas reações de RT-PCR e *seminested* PCR.

Gene (Genótipo)	Ciclo	
	RT-PCR	<i>Seminested</i> PCR
<b>VP7 (G)</b>	95 °C / 3 min	95 °C / 3 min
	94 °C / 40 segundos 40 °C / 1 min 72 °C / 2 min	94 °C / 40 segundos 40 °C / 1 min 72 °C / 1 min 50 segundos
	} x 40	} x 35
	72 °C / 10 min	72 °C / 10 min
<b>VP4 (P)</b>	95 °C / 3 min	95 °C / 3 min
	94 °C / 40 segundos 40 °C / 1 min 72 °C / 2 min 30 segundos	94 °C / 40 segundos 40 °C / 1 min 72 °C / 1 min 50 segundos
	} x 40	} x 35
	72 °C / 10 min	72 °C / 10 min
<b>VP6 (I)</b>	95 °C / 3 min	95 °C / 3 min
	94 °C / 40 segundos 40 °C / 1 min 72 °C / 2 min 20 segundos	94 °C / 40 segundos 40 °C / 1 min 72 °C / 2 min
	} x 40	} x 35
	72 °C / 10 min	72 °C / 10 min

**Quadro S5.** Iniciadores utilizados nas reações de *multiplex seminested* PCR para a identificação dos genótipos G (VP7), P (VP4), I (VP6), E (NSP4) e H (NSP5) das estirpes de RVA detectadas no estudo.

Iniciador	Sentido	Sequência 5'→3'	Posição (nt) <sup>1</sup>	Tamanho do fragmento (pb) <sup>2</sup> (Genótipo)	Referência
<b><u>VP7</u></b>					
<b>RT-PCR</b>					
<b>sBeg9</b>	Senso	GGCTTTAAAAGAGAGAATTTC	1-21	1062	Gouvea <i>et al.</i> , 1990
<b>End9</b>	Antissenso	GGTCACATCATAACAATTCTAATCTAAG	1036 - 1062		
<b><u>Genotipagem</u></b>					
<b>Pool G A</b>					
<b>End9</b>	Antissenso	GGTCACATCATAACAATTCTAATCTAAG	1036 - 1062	586 (G1) 901 (G8) 408 (G3)	Gouvea <i>et al.</i> , 1990
<b>VP7.G1-477</b>	Senso	GTATGATCAAAATCTTGAATTA	477 - 499		
<b>VP7.G8-162</b>	Senso	GCTTTTGTGTTATTGTCA	162 - 182		Este estudo
<b>VP7.G3-655</b>	Senso	TCTTGGAATTGGMTGCTTGAC	655 - 676		
<b>Pool G B</b>					
<b>End9</b>	Antissenso	GGTCACATCATAACAATTCTAATCTAAG	1036 - 1062	941 (G20)	Gouvea <i>et al.</i> , 1990
<b>VP7.G20</b>	Senso	TAGAGGACAAAATTATGGCCT	122-143		Este estudo
<b><u>VP4</u></b>					
<b>RT-PCR</b>					
<b>CON3.mod</b>	Senso	TGGCTTCRCTGATHAYAGACA	11-31	877	Este estudo
<b>CON2.mod</b>	Antissenso	AYTTCTGACCAATTATAHCC	868 - 887		
<b><u>Genotipagem</u></b>					
<b>Pool P A</b>					
<b>CON2.mod</b>	Antissenso	AYTTCTGACCAATTATAHCC	868 - 887	815 (P[14]) 701 (P[?]) 587 (P[40]) 493 (P[1])	Este estudo
<b>VP4.P14-73</b>	Senso	GTTAGTGAAATCGGAGCTAG	73-92		
<b>VP4.P?-187</b>	Senso	TATTCAACCTACATTAGATGG	187-207		
<b>VP4.P40-301</b>	Senso	CTCAAACAGATGGCTAGCAAT	301-320		
<b>VP4.P1-449</b>	Senso	CAAGATGGTAATTATTCACAG	449-469		
<b>Pool P B</b>					
<b>CON3.mod</b>	Senso	TGGCTTCRCTGATHAYAGACA	11-31	269 (P[6])	Este estudo
<b>VP4.P6-279</b>	Antissenso	TTGTTGATTAGTTGGATTCAAT	258 - 279		

<b>VP4.P2-430</b>	Antissenso	TAAATTTCCACTGGTCTTGTGAAGT	406 - 430	420 (P[2])	
<b>VP4.P8-609</b>	Antissenso	AATTGTAATTGATATACCGTTCA	587 - 609	599 (P[8])	
<b><u>VP6</u></b>					
<b>RT-PCR</b>					
<b>GEN_VP6F</b>	Senso	GGCTTTWAAACGAAGTCTTC	1-20	1356	Matthijnssens <i>et al.</i> , 2008a
<b>GEN_VP6R</b>	Antissenso	GGTCACATCCTCTCACT	1340 - 1356		
<b>Genotipagem</b>					
<b>Pool I A</b>					
<b>GEN_VP6F</b>	Senso	GGCTTTWAAACGAAGTCTTC	1-20		Matthijnssens <i>et al.</i> , 2008a
<b>VP6.I1-381</b>	Antissenso	CTAGCTTTCTCAATGCCTCA	361 - 381	381 (I1)	Este estudo
<b>6END.682.mod</b>	Antissenso	GTAGTTAACACTCTCCGG	664 - 682	682 (I2)	
<b>Pool I B</b>					
<b>GEN_VP6R</b>	Antissenso	GGTCACATCCTCTCACT	1340 - 1356		Matthijnssens <i>et al.</i> , 2008a
<b>VP6.I8-953</b>	Senso	TGCTCAACCTTTTGTTAATCAC	953 - 975	404 (I8)	Este estudo
<b>VP6.I13-842</b>	Senso	TGCTGCACGTTATGGAACC	842 - 861	515 (I3)	
<b><u>NSP4</u></b>					
<b>RT-PCR</b>					
<b>NSP4-1a</b>	Senso	GCCTTTTAAAAGTTCTGTTCCG	1 - 22	750	Kudo <i>et al.</i> , 2001
<b>NSP4-2b</b>	Antissenso	GGTCACATTAAGACCGTTCC	731 - 750		
<b>Genotipagem</b>					
<b>Pool E</b>					
<b>NSP4-2b</b>	Antissenso	GGTCACATTAAGACCGTTCC	731 - 750		Kudo <i>et al.</i> , 2001
<b>NSP4.E16-311</b>	Senso	AAATAAGGATGAAATTGAAAAACAG	311 - 336	440 pb / E16	
<b>NSP4.E3-439</b>	Senso	TGCTGATAATTAGACCAGTTGAT	439 - 462	312 (E3)	Este estudo
<b>NSP4.E1-246</b>	Senso	GATCAAGTATTGTATAGTCACA	246 - 268	505 (E1)	
<b>NSP4.E2-108</b>	Senso	ACAATACTAGAGGATCCAGGA	108 - 129	643 (E2)	
<b><u>NSP5</u></b>					
<b>RT-PCR</b>					
<b>GEN_NSP5F</b>	Senso	GGCTTTTAAAGCGCTACAG	1-19	667	Matthijnssens <i>et al.</i> , 2008
<b>GEN_NSP5R</b>	Antissenso	CCTGTTCTTTATAACCAGCC	651-667		
<b>Genotipagem</b>					
<b>Pool H A</b>					

<b>GEN_NSP5R</b>	Antissenso	CCTGTTCTTTATAACCAGCC	651-667		Matthijnssens <i>et al.</i> , 2008a
<b>NSP5.H6-396</b>	Senso	TATTCAGTATCCACAGTTTCT	396 - 418	272 (H6)	
<b>NSP5.H1-477</b>	Senso	TTCTGATTCTGAAGATTATATTT	477 - 500	191 (H1)	Este estudo
<b>NSP5.H2-108*</b>	Senso	TCTAAACAAGAAAACAGAAA	108 - 450	393 (H2)	
<b><i>Pool H B</i></b>					
<b>GEN_NSP5F</b>	Senso	GGCTTTTAAAGCGCTACAG	1-19		Matthijnssens <i>et al.</i> , 2008a
<b>NSP5.H5-387</b>	Antissenso	CAAATTAGCTTTTACTTTTAAGC	364 - 387	387 (H5)	
<b>NSP5.H3-436</b>	Antissenso	TTTTGGATTCTCTTTCTTTAAATTAGTT	407 - 436	436 (H3)	Este estudo

Oligonucleotídeos degenerados; R= A/G, W= A/T, Y= C/T, M= A/C, H= A/C/T; <sup>1</sup> nt = nucleotídeo; \* = o gene que codifica a proteína NSP5 especificamente o genótipo H2 é produto de uma recombinação que faz que o gene completo seja maior a 650 pb.

**Quadro S6.** Ciclos utilizados para a genotipagem por *multiplex seminested* PCR.

<b>Gene (Genótipo)</b>	<b>RT-PCR</b>	<b>Pool A</b>	<b>Pool B</b>
<b>VP7 (G)</b>	95 °C / 3 min  94 °C / 40 segundos 40 °C / 1 min 72 °C / 2 min } x 40  72 °C / 10 min	95 °C / 3 min  94 °C / 40 segundos 50 °C / 1 min 72 °C / 1 min 50 segundos } x 35  72 °C / 10 min	95 °C / 3 min  94 °C / 40 segundos 50 °C / 1 min 72 °C / 1 min 50 segundos } x 35  72 °C / 10 min
<b>VP4 (P)</b>	95 °C / 3 min  94 °C / 40 segundos 40 °C / 1 min 72 °C / 1 min 50 segundos } x 40  72 °C / 10 min	95 °C / 3 min  94 °C / 40 segundos 50 °C / 1 min 72 °C / 1 min 50 segundos } x 35  72 °C / 10 min	95 °C / 3 min  94 °C / 40 segundos 50 °C / 1 min 72 °C / 1 min 30 segundos } x 35  72 °C / 10 min
<b>VP6 (I)</b>	95 °C / 3 min  94 °C / 40 segundos 40 °C / 1 min 72 °C / 2 min 20 segundos } x 40  72 °C / 10 min	95 °C / 3 min  94 °C / 40 segundos 49 °C / 1 min 72 °C / 1 min 30 segundos } x 35  72 °C / 10 min	95 °C / 3 min  94 °C / 40 segundos 49 °C / 1 min 72 °C / 1 min 30 segundos } x 35  72 °C / 10 min
<b>NSP4 (E)</b>	95 °C / 10 min  94 °C / 1 min 40 °C / 1 min 72 °C / 1 min 40 segundos } x 40  72 °C / 10 min	95 °C / 10 min  94 °C / 1 min 52 °C / 1 min 72 °C / 1 min 30 segundos } x 35  72 °C / 10 min	
<b>NSP5</b>	95 °C / 10 min	95 °C / 10 min	95 °C / 10 min



<b>(H)</b>	94 °C / 1 min 50 °C / 1 min 72 °C / 1 min 40 segundos } x 40	94 °C / 1 min 50 °C / 1 min 72 °C / 1 min 20 segundos } x 35	94 °C / 1 min 48 °C / 1 min 72 °C / 1 min 30 segundos } x 35
	72 °C / 10 min	72 °C / 10 min	72 °C / 10 min

**Quadro S7.** Iniciadores utilizados para amplificação e sequenciamento dos 11 segmentos genômicos da estirpe RVA/Alpacac/PER/SA44/2014/G3P[40].

Gene	Iniciador	Sequência 5'→3'	Posição (nt) <sup>1</sup>	Referência
VP1	VP1.4F	GGCTATTAAGCTAACAAT	1-20	Matthijnsens <i>et al.</i> , 2008a
	VP1.14R	GGTCACATCTAAGCGCTCT	3284-3302	
	VP1.3R	TGGTTTATCTTTCATCACA	600-618	
	VP1.1F	TAGTCAAATATGCGAAAGGTAAAC	284-307	
	VP1.5F	ATGAAGAGTTAGAATTAGAGTTTT	809-832	
	VP1.8R	TTATCATCACCGTCAACT	1899-1916	
VP2	VP2.1F	GGCTATTAAGGCTCAATGG	1-20	Matthijnsens <i>et al.</i> , 2008a
	VP2.12R	TYTACARTTCGTTTCATGATGC	2670-2690	
	VP2.2R	TTGGATGTAATATTGATGGAT	763-782	
	VP2.4R	CCGTCAATAGCCACATAC	1266-1283	
	VP2.5F	GTCACAAGATTTGCAATTAGA	1093-1113	
	VP2.6R	TGATCTYTTATAATCAAYTGG	1610-1630	
	VP2.8R	AATGTTTGTGGACTTGGTA	1827-1845	
	VP2.7F	ACACCGTTTCAGATAGCAG	1406-1424	
	VP2.11F	RGAGGGATTTCAACAGATA	238-256	
VP2.12R	TYTACARTTCGTTTCATGATGC	2670-2690		
VP3	GEN_VP3.FM	GTAGTGYGTTTTACCTCTGATGGTGT	20-45	Este estudo
	VP3.R	AADGTAAACATAGATTCATTHC	684-705	
	GEN_VP3.2RM	GTCACATCRTGACTRGTGTGTTAAGT	2565-2590	
	VP3.F	GGATGGAAATTAACRTATGT	410-429	
	VP3.1R	TCTGATCTRACTTCAGTWGTTGGATG	1247-1272	
	VP3.1F	TGTTGTGTGAAAATGACTGCHATGGA	1187-1212	
	VP3.3R	TTTGCR AATTGATCCAAYTTAWAATA	1718-1743	
	VP3.2F	ACDTTTAAAGATGAACCRAAAGT	1526-1548	
	VP3.4R	TCTATHGGAGCGTGYTCATAATA	1988-2010	
GEN_VP3.2RM	GTCACATCRTGACTRGTGTGTTAAGT	2565-2590		
VP4	F4	TATAAAATGGCTTTCIYTVAT	4-23	Homma <i>et al.</i> , 2007
	VP4.M1.R	CTNGGTAHAATATAAAANTCA	618-638	Este estudo
	VP4.M2.R	TTGGTTGTTGAGTAATATCCG	567-587	

	CON3	TGGCTTCGCTCATTTATAGACA	11-31	Gentsh <i>et al.</i> , 1992
	CON2	ATTTCGGACCATTTATAACC	868-887	Santos <i>et al.</i> , 2008
	F1	TRCCDCCAATACARAAYACNA	697-717	Este estudio
	F2	TDTGGAAAGARATGCARTATAA	800-821	
	C8	ATTGGIGTYTGATAITCRTC	1446-1467	Homma <i>et al.</i> , 2007
	S.1368	CCRGCHGCNAATCCAAA	1368-1384	Este estudio
	A.2027	ATRAATTTYTCTGAYGMITTCAG	2006-2027	
	S.1609	TDGAYATGTTCTCHATGTT	1591-609	
	S.1732	TRTCDGAHGC GG CWTCATC	1714-1732	
	P28	GGTCACATCCTATGACAA	2341-2361	
VP6	GEN_VP6F	GGCTTTWAAACGAAGTCTTC	1-20	Matthijnssens <i>et al.</i> , 2008a
	GEN_VP6R	GGTCACATCCTCTCACT	1340-1356	
	VP6.F-Deg	CTACDTGGTATTTYAAAYCCAGT	757-778	Este estudio
	VP6.F.1.Deg	TKAGACCACCAAAYATGACRCCMG	907-930	
	VP6.R	GTCCAATTCATNCCTGGTGG	1106-1126	Iturriza-Gómarra <i>et al.</i> , 2002
VP7	Beg9F	GGCTTTAAAAGAGAGAATTTCCGTCTGG	1-21	Gouvea <i>et al.</i> , 1990
	End9R	GGTCACATC ATACAATTCTAATCTAAG	1036-1062	
	9Con1	TAGCTCCTTTTAATGTATGG	37-56	Das <i>et al.</i> , 1994
	G922R	GTRTARAAIACTTGCCACCA	922-941	Chizhikov <i>et al.</i> , 2002
NSP1	GEN_NSP1.3FM	AGCCATGGCTACTTTYAAAGA	29-49	Este estudio
	MAX_NSP1.4FM	AAAGGDTGGTGCTTGGATTGYTGTC A	147-172	
	GEN_NSP1.4RM	TGCTGNCTAGGCGCTACTC	1577-1595	
NSP2	GEN_NSP2.1F	GGCTTTTAAAGCGTCTCAG	1-19	Matthijnssens <i>et al.</i> , 2008a
	GEN_NSP2.2R	GGTCACATAAGCGCTTTC	993-1010	
NSP3	GEN_NSP3.1F	GGCTTTTAATGCTTTTCAGTG	1-21	Matthijnssens <i>et al.</i> , 2008a
	GEN_NSP3.2R	ACATAACGCCCTATAGC	1054-1074	
NSP4	NSP4-1aF	GCCTTTTAAAAGTTCTGTTCC	1-22	Kudo <i>et al.</i> , 2001
	NSP4-2bR	GGTCAC ATT AAG ACC GTT CC	731-750	
	NSP4.F.M	GAGAGAGCGGTGCGGAAAGATGG	22-45	Este estudio

NSP5	GEN_NSP5F	GGCTTTTAAAGCGCTACAG	1-19	Matthijnssens <i>et al.</i> , 2008a
	GEN_NSP5R	GGTCACAAAACGGGAGT	651-667	

Oligonucleotídeos degenerados; R= A/G, W= A/T, Y= C/T, M= A/C, H= A/C/T; I = inosina.

## **10. Anexos**