BRUNA ROCHA PASSOS BARBOSA

Caracterização e análise molecular dos genes codificadores das proteínas não estruturais 2 e 5 (NSP2 e NSP5) de rotavírus suínos

> São Paulo 2013

BRUNA ROCHA PASSOS BARBOSA

Caracterização e análise molecular dos genes codificadores das proteínas não estruturais 2 e 5 (NSP2 e NSP5) de rotavírus suínos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de Concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Fábio Gregori

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

| T.2764 FMVZ | Barbosa, Bruna Rocha Passos Caracterização e análise molecular dos genes codificadores das proteínas não estruturais 2 e 5 (NSP2 e NSP5) de rotavírus suínos / Bruna Rocha Passos Barbosa 2013. 101 f. : il. |
|----------------|---|
| | Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2013. |
| | Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses. |
| | Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses. |
| | Orientador: Prof. Dr. Fábio Gregori. |
| | 1. Rotavírus. 2. Suíno. 3. Diagnóstico. 4. PCR. 5. Medicina veterinária preventiva. I. Título. |
| | |



FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Caracterização e análise molecular dos genes codificadores das proteínas não-estruturais 2 e 5 (NSP2 e NSP5) de rotavírus suínos", protocolado sob o nº 2066/2010, utilizando amostras fecais de 10 (dez) suínos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Fabio Gregori, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 08/12/2010.

We certify that the Research "Molecular characterization and analysis of porcine rotavirus non-structural proteins 2 and 5 (NSP2 and NSP5) coding genes", protocol number 2066/2010, utilizing 10 (ten) pigs, under the responsibility Prof. Dr. Fabio Gregori, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 12/08/2010.

São Paulo, 09 de dezembro de 2010

incline + samel

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni Presidente



Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87 Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" São Paulo/SP – Brasil 05508-270 Fax: +55 11 3032-2224 / 3091-7757 Fone: + 55 11 3091-7671/7676 E-mail: fmvz@usp.br http://www.fmvz.usp.br

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: BARBOSA, Bruna Rocha Passos

Título: Caracterização e análise molecular dos genes codificadores das proteínas não estruturais 2 e 5 (NSP2 e NSP5) de rotavírus suínos.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data:___/__/___

Banca Examinadora

| Prof. Dr | | |
|--------------|-------------|--|
| Instituição: | Julgamento: | |
| Prof. Dr | | |
| Instituição: | Julgamento: | |
| Prof. Dr | | |
| Instituição: | Julgamento: | |

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, José Damilton Barbosa e Nilza Barbosa,

Aos meus irmãos, Dadá, Waldir e Veridiana,

Por terem sido o exemplo, o apoio, a ajuda e o carinho, sempre presentes,

Todo amor que houver nessa vida para vocês!

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser a Ajuda, a Fortaleza e a Confiança em todos os momentos.

Ao meu orientador, Fábio Gregori, pelos ensinamentos e conselhos ao longo do caminho.

Ao Prof. Paulo Eduardo Brandão, pela ajuda sempre oportuna e serena.

Aos professores Nilson Benites, José Antônio Jerez e Ricardo Augusto Dias pela sabedoria transmitida em meio às dúvidas e preocupações e, claro, pela amizade e carinho que levarei sempre comigo.

Aos demais professores do VPS.

À Laila Andreia, Nara Thiers, Rodrigo Gadelha e Diogo Robl pela fraternidade e parceria que nunca faltaram. Obrigada por tudo!

Aos colegas de pós-graduação pelos momentos compartilhados e que tornaram essa 'viagem' mais divertida.

Aos funcionários do VPS pela convivência e disposição para ajudar sempre que preciso.

À FAPESP, pela bolsa concedida (Proc. nº 2010/13652-8).

Este trabalho contou com o apoio financeiro de:



Proc. nº 2010/13652-8

RESUMO

BARBOSA, B. R. P. **Caracterização e análise molecular dos genes codificadores das proteínas não estruturais 2 e 5 (NSP2 e NSP5) de rotavírus suínos.** [Characterization and molecular analysis of genes coding for non-structural proteins 2 and 5 (NSP2 and NSP5) of swine rotavirus]. 2013. 101 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Os rotavírus são os responsáveis pela ocorrência de diarreias em humanos e outras diversas espécies animais. Estão amplamente disseminados na suinocultura, inclusive no Brasil. As proteínas não estruturais 2 e 5 (NSP2 e NSP5) dos rotavírus estão envolvidas nas etapas de replicação viral, sendo essenciais para a formação do viroplasma, uma estrutura citoplasmática no interior da qual ocorre a morfogênese das novas partículas virais. Entretanto, são escassos os estudos sobre a diversidade genética destas proteínas em rotavírus circulantes nas criações brasileiras. Até o presente momento, a NSP2 pode ser classificada em nove genotipos (N1 ao N9) e a NSP5, 11 (H1 ao H11), sendo que em humanos foram descritos os genotipos N1, N2, N3 e H1, H2 e H3, e em suínos N1 e H1. Este estudo teve o objetivo de caracterizar as amostras circulantes de rotavírus em termos da diversidade da NSP2 e NSP5. Para isso, um total de 63 amostras fecais provenientes de criações de suínos localizadas em seis diferentes municípios do Estado de São Paulo, Brasil, foram previamente triadas mediante a técnica de nested-PCR. Destas, nove tiveram os respectivos segmentos genômicos amplificados pela reação de RT-PCR, sendo que em sete foi possível o sequenciamento nucleotídico parcial para NSP2 e, em seis, o sequenciamento total para NSP5. Todas foram caracterizadas como genotipo N1 e H1. Considerando o gene NSP2, nas amostras aqui definidas, a identidade nucleotídica variou de 100% a 86,4%, e em termos de aminoácidos, de 100% a 91,5%, enquanto que para NSP5 foi de 100% a 95,1%, e de 100% a 97,4% respectivamente para nucleotídeos e aminoácidos. Conclui-se que os genotipos das amostras circulantes na região de estudo estão em concordância com aqueles descritos na literatura para a espécie suína, e que há a hipótese de interação entre rotavirus de origem humana e animal. Estes dados são úteis para uma vigilância mais abrangente dos rotavírus circulantes e contribuem para uma melhor compreensão da patogenia, epidemiologia e prevenção da doença, inclusive no que diz respeito ao seu caráter zoonótico.

Palavras-chave: Rotavírus. Suíno. Diagnóstico. PCR. Medicina Veterinária Preventiva.

ABSTRACT

BARBOSA, B. R. P. **Characterization and molecular analysis of genes coding for nonstructural proteins 2 and 5 (NSP2 and NSP5) of swine rotavirus.** [Caracterização e análise molecular dos genes codificadores das proteínas não estruturais 2 e 5 (NSP2 e NSP5) de rotavírus suínos]. 2013. 101 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Rotaviruses are responsible for the occurrence of diarrhea in humans and several other animal species. They are widespread in pig farms, including in Brazil. The non-structural proteins 2 and 5 (NSP2 and NSP5) of rotavirus are involved in viral replication and they are essential for the formation of viroplasm, a cytoplasmic structure within which occurs morphogenesis of new viral particles. However, there are very few studies on the genetic diversity of those proteins in circulating rotavirus in Brazilian swine raisings. So far, nine NSP2 genotypes have been identified (N1 to N9) and eleven for NSP5 (H1 to H11). In humans, genotypes N1, N2, N3 and H1, H2, H3 have been described, whereas in pigs, H1 and N1 have been described. This study is aimed at characterizing circulating samples of rotavirus in terms of diversity of NSP2 and NSP5. For this purpose, a total of 63 fecal samples from pig farms located in six different cities in the state of São Paulo, Brazil, were previously screened by nested-PCR technique. Of those, nine had their genomic segments amplified by RT-PCR, and in seven it was possible to obtain the partial nucleotide sequencing for NSP2, whereas in six, the total sequencing for NSP5. All were characterized as genotype H1 and N1. Considering the gene NSP2, the strains' nucleotide identity, defined herein, ranged from 100% to 86.4% and in terms of amino acids, from 100% to 91.5%. Whereas for NSP5, it was from 100% to 95.1 %, and 100% to 97.4% for nucleotides and amino acids, respectively. It is concluded that the genotypes of the strains circulating in the region of study are in agreement with those reported in literature for swine, and that there is the possibility of interaction between human and animal rotaviruses. These data are useful for a broader surveillance of circulating rotaviruses and contribute to a better understanding of the pathogenesis, epidemiology and disease prevention, especially in regard to its zoonotic aspect.

Keywords: Rotavirus. Swine. Diagnostic. PCR. Preventive Veterinary Medicine.

LISTA DE FIGURAS

| Figura 1 – | Viroplasmas detectados no citoplasma de células infectadas mediante imunofluorescência com antissoro específico para NSP2 e a forma funcional da NSP2, um octâmero formado a partir da interação entre dois tetrâmeros | 29 |
|------------|---|----|
| Figura 2 – | Alinhamento do fragmento parcial (926 nt) do gene codificador da proteína NSP2 de rotavírus suínos gerados no presente estudo – São Paulo – 2013 | 49 |
| Figura 3 – | Alinhamento da sequência traduzida para aminoácidos do gene codificador da proteína NSP2 de rotavírus suínos gerados no presente estudo. A área em destaque refere-se ao domínio de ligação ao RNA (aa 205 a 241). As setas representam os resíduos de cisteína envolvidos nas pontes dissulfídicas (resíduos 6, 8, 85 e 285) – São Paulo – 2013 | 51 |
| Figura 4 – | Alinhamento do fragmento completo (664 nt) do gene codificador da proteína NSP5 de rotavírus suínos gerados no presente estudo – São Paulo – 2013 | 52 |
| Figura 5 – | Alinhamento da sequência traduzida para aminoácidos do gene codificador da proteína NSP5 de rotavírus suínos gerados no presente estudo. As setas representam os locais de fosforilação (resíduos 2, 4, 30, 37, 42, 56, 67, 101, 127, 163), com destaque para o resíduo 37 (seta vermelha) onde houve mudança do aminoácido serina – São Paulo – 2013. | 53 |
| Figura 6 – | Alinhamento do fragmento completo (276 nt) do gene codificador da proteína NSP6 de rotavírus suínos gerados no presente estudo – São Paulo – 2013 | 54 |
| Figura 7 – | Alinhamento da sequência traduzida para aminoácidos do gene codificador da proteína NSP6 de rotavírus suínos gerados no presente estudo – São Paulo – 2013 | 55 |
| Figura 8 – | Árvore filogenética construída com o método de <i>neighbor-joining</i> usando <i>maximum composite likelihood</i> como modelo de substituição (Software Mega v. 5) para o fragmento parcial (926 nt) do gene codificador da proteína NSP2 dos rotavírus. As amostras apresentam a identificação <i>accession number</i> / hospedeiro / amostra / genotipo NSP2. Os números próximos a cada nó representam os valores de 1000 repetições de <i>bootstrap</i> , tendo sido demonstrados apenas aqueles superiores a 70%. As amostras de suínos definidas neste estudo estão marcadas com triângulos pretos. A escala representa o número de substituições – São Paulo – 2013 | 60 |

Figura 9 – Árvore filogenética construída com o método de *neighbor-joining* usando *maximum composite likelihood* como modelo de substituição (Software Mega v. 5) para o fragmento completo (594 nt) do gene codificador da proteína NSP5 dos rotavírus. As amostras apresentam a identificação *accession number*/ hospedeiro / amostra / genotipo NSP5. Os números próximos a cada nó representam os valores de 1000 repetições de *bootstrap*, tendo sido demonstrados apenas aqueles superiores a 70%. As amostras de suínos definidas neste estudo estão marcadas com triângulos pretos. A escala representa o número de substituições – São Paulo – 2013.....

61

LISTA DE QUADROS

| Quadro 1 – | Descrição dos primers utilizados no presente estudo, dirigidos aos genes da NSP2 e NSP5, para detecção de rotavírus suíno – São Paulo – 2013 | 40 |
|-------------|--|----|
| Quadro 2a – | Sequências do gene NSP2 de rotavírus recuperadas do GenBank utilizadas para a reconstrução da genealogia, segundo número de acesso, genotipo da amostra e hospedeiro – São Paulo – 2013 | 43 |
| Quadro 2b – | Sequências do gene NSP5 de rotavírus recuperadas do GenBank utilizadas para a reconstrução da genealogia, segundo número de acesso, genotipo da amostra e hospedeiro – São Paulo – 2013 | 44 |
| Quadro 2c – | Sequências do gene NSP6 de rotavírus recuperadas do GenBank utilizadas para a determinação da identidade nucleotídica e de aminoácidos, segundo número de acesso e hospedeiro – São Paulo – 2013 | 45 |
| Quadro 3 – | Relação dos municípios de origem das amostras, tamanho dos fragmentos dos genes sequenciados e número de acesso GenBank – São Paulo – 2013 | 48 |
| Quadro 4 – | Valores de similaridade nucleotídica e de aminoácidos da região consensual das sequências de rotavírus geradas neste estudo (SWRV1 a SWRV7), bem como frente às demais representativas do genotipo N1 de NSP2 depositadas no Genbank – São Paulo – 2013 | 56 |
| Quadro 5 – | Valores de similaridade nucleotídica e de aminoácidos da região consensual das sequências de rotavírus geradas neste estudo (SWRV1 a SWRV6), bem como frente às demais representativas do genotipo H1 de NSP5 depositadas no Genbank – São Paulo – 2013 | 57 |
| Quadro 6 – | Valores de similaridade nucleotídica e de aminoácidos da região consensual das sequências de rotavírus geradas neste estudo (SWRV1 a SWRV6), bem como frente às demais sequências do gene NSP6 depositadas no Genbank – São Paulo – 2013 | 57 |

LISTA DE APÊNDICES

| Apêndice A – | Sequências nucleotídicas parciais do segmento 8 e completas do segmento 11 de rotavírus suínos | 85 |
|--------------|---|-----|
| Apêndice B – | Alinhamento das sequências de nucleotídeos e de aminoácidos das amostras do presente estudo com as demais representativas do genotipo 1 da NSP2 | 90 |
| Apêndice C – | Alinhamento das sequências de nucleotídeos e de aminoácidos das amostras do presente estudo com as demais representativas do genotipo 1 da NSP5 | 95 |
| Apêndice D – | Alinhamento das sequências de nucleotídeos e de aminoácidos das amostras do presente estudo com as demais de NSP6 | 97 |
| Apêndice E – | Valores de similaridade nucleotídica e de aminoácidos da região consensual das sequências de rotavírus geradas neste estudo (SWRV1 a SWRV7) frente às demais representativas do genotipo N1 de NSP2 depositadas no GenBank. As áreas em branco representam as identidades nucleotídicas, e as cinzas, as identidades de aminoácidos - São Paulo - 2013 | 99 |
| Apêndice F – | Valores de similaridade nucleotídica e de aminoácidos da região consensual das sequências de rotavírus geradas neste estudo (SWRV1 a SWRV6) frente às demais representativas do genotipo H1 de NSP5 depositadas no GenBank. As áreas em branco representam as identidades nucleotídicas, e as cinzas, as identidades de aminoácidos - São Paulo - 2013 | 100 |
| Apêndice G – | Valores de similaridade nucleotídica e de aminoácidos da região consensual das sequências de rotavírus geradas neste estudo (SWRV1 a SWRV6) frente às demais representativas de NSP6 depositadas no GenBank. As áreas em branco representam as identidades nucleotídicas, e as cinzas, as identidades de aminoácidos - São Paulo - 2013 | 101 |
| | | |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aa = aminoácido ATP = adenosina trifosfatob = base nucleotídica BLAST/n = Basic Local Alignment Search Tool cDNA = DNA complementar CK1 = proteína caseína quinase 1DEPC = dietil-pirocarbonato DNA = ácido desoxirribonucléico dNTP = deoxinucleosídeo-trifosfatodsRNA = RNA dupla fitaEDTA = ácido etilenoamino tetra-acético eIF4G = fator eucariótico de iniciação da tradução et al. = e colaboradores g = aceleração da gravidade terrestre (9,8 m/s2)kDa = quiloDaltonM = MolarME = Microscopia eletrônica min = minuto de hora mL = mililitromM = milimolarmRNA = RNA mensageiro NCDV = Nebraska calf diarrhea virus NDP = Nucleosídeo difosfato ng = nanograma nm = nanômetro NSP = proteína não estrutural nt = nucleotídeo NTP = nucleosídeo trifosfato NTPase = proteína nucleosídeo trifosfatase

ORF = open reading frame

PAGE = eletroforese em gel de poliacrilamida

pb = pares de bases

- PCR = reação em cadeia pela polimerase
- PDC = partículas de dupla camada
- pH = potencial hidrogeniônico
- p/v = proporção peso e volume

RE = retículo endoplasmático

RNA = ácido ribonucleico

RT-PCR = reação em cadeia pela polimerase precedida por transcrição reversa

RV = Rotavirus

RVA = Rotavirus do grupo A

S = Segmento genômico

ssRNA = RNA fita simples

TRIS = hidroximetil-aminometano

VLS = estruturas semelhantes aos viroplasmas

VP = proteína estrutural

WHO = Organização Mundial da Saúde

 $\mu g = micrograma$

 $\mu L = microlitro$

SUMÁRIO

| 1 INTRODUÇÃO | 19 |
|--|----|
| 2 REVISÃO DE LITERATURA | 21 |
| 2.1 Rotaviroses | 21 |
| 2.1.1 Impacto na Suinocultura | 21 |
| 2.1.2 Importância em Saúde Pública | 22 |
| 2.2 Rotavírus | 23 |
| 2.2.1 Características morfológicas e físico-química | 24 |
| 2.2.2 Genoma viral | 25 |
| 2.2.3 Proteínas estruturais | 26 |
| 2.2.4 Proteínas não estruturais | 27 |
| 2.2.5 NSP2, NSP5 e NSP6 | 27 |
| 2.2.6 Evolução viral | 31 |
| 2.2.7 Replicação viral | 33 |
| 2.2.8 Genotipos | 34 |
| 3 OBJETIVOS | 37 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS | 38 |
| 4.1 Amostras | 38 |
| 4.2 Diagnóstico de rotavírus | 38 |
| 4.3 Extração de RNA | 40 |
| 4.4 <i>RT-PCR</i> | 41 |
| 4.5 Sequenciamento de DNA | 42 |
| 4.6 Análise das sequências | 42 |
| 5. RESULTADOS | 47 |
| 5.1 Reações de RT-PCR visando os genes codificadores das NSP2, NSP5 e NSP6 | 47 |
| 5.2 Reação de sequenciamento nucleotídico | 47 |
| 5.3 Alinhamento das sequências geradas | 48 |
| 5.4 Matrizes de identidade | 55 |
| 5.5 Alinhamento das sequências de aminoácidos | 58 |
| 5.6 Inferências filogenéticas a partir das sequências nucleotídicas | 58 |
| 6 DISCUSSÃO | 62 |

| 7 CONCLUSÕES | 70 |
|--------------|----|
| REFERÊNCIAS | 71 |
| APÊNDICES | 85 |

1 INTRODUÇÃO

A diarreia é um dos maiores problemas enfrentados pelos produtores de suínos devido aos prejuízos econômicos decorrentes desta enfermidade, no que diz respeito aos custos com tratamento, morte e queda na produtividade. Neste contexto, os rotavírus do grupo A (RVA) são considerados os principais agentes virais envolvidos nos quadros de diarreia, não só em leitões como em outras espécies animais (ALFIERI et al., 1999a; ESTES; KAPIKIAN, 2007).

Além disso, no âmbito epidemiológico o rotavírus merece destaque devido ao seu caráter zoonótico e capacidade de transmissão interespécies. Inclusive em humanos, este agente está envolvido com a ocorrência da gastroenterite infecciosa em crianças (PAHO, 2001; COOK et al., 2004; MARTELLA et al., 2005; TATE et al., 2012).

Trata-se de um enteropatógeno pertencente à família *Reoviridae*, com RNA de fita dupla, não envelopado, e que possui elevada variabilidade antigênica e genética (ESTES; KAPIKIAN, 2007). A principal forma de transmissão é a via fecal-oral, ocorrendo ainda por meio de água e alimentos contaminados (MARTELLA et al., 2010).

As proteínas virais VP4 e VP7 possuem um papel central na classificação e escolha de estirpes vacinais de rotavírus, porém há a necessidade de se associarem conhecimentos acerca do papel das demais proteínas, dentre elas as não estruturais 2 e 5 (NSP2 e NSP5), pois guardam diversas implicações quanto ao modo de parasitismo do agente ou mesmo para servirem como marcadores adicionais visando o diagnóstico, a caracterização molecular e relações zoonóticas.

Sabe-se que tais proteínas, NSP2 e NSP5, são essenciais para a replicação dos rotavírus, uma vez que estão envolvidas na formação de estruturas citoplasmática específicas de "montagem", chamadas viroplasmas, no interior das quais se inicia a morfogênese de novas partículas virais (EICHWALD et al., 2004a; CARREÑO-TORRES et al., 2010).

O segmento genômico codificador da NSP5 contém uma segunda região aberta de leitura (ORF) que codifica outra proteína, a NSP6, cuja função ainda é pouco conhecida, mas que preliminarmente interage com a NSP5 nos processos de hiperfosforilação. No entanto,

dados os seus baixos níveis de expressão, sugere-se que ela não tenha um papel regulatório essencial (SAMANIEGO-HERNÁNDEZ et al., 2006).

No tocante à caracterização de amostras de rotavírus circulantes em diversas localidades, ainda são muito escassos trabalhos no Brasil visando à caracterização e análise da NSP2 e NSP5, principalmente em suínos, uma vez que a maior parte dos trabalhos presentes na literatura refere-se a amostras humanas. Desta forma, pretende-se com este estudo contribuir para uma melhor compreensão da patogenia, epidemiologia e prevenção da doença, inclusive no que diz respeito ao caráter zoonótico do agente.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Rotaviroses

2.1.1 Impacto na Suinocultura

A suinocultura desponta como um dos pilares do agronegócio no Brasil. O mercado conta com 40 mil suinocultores, e uma produção de aproximadamente 3,4 milhões de toneladas no ano de 2011, segundo o último relatório da Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína (ABIPECS). O tamanho do setor o qualifica como um dos responsáveis pelo desenvolvimento econômico e social de vários municípios brasileiros, gerando mais de 600 mil empregos no campo, na indústria, no comércio e nos serviços, e classifica o Brasil como o quarto maior exportador mundial, atrás de Canadá, Estados Unidos e União Européia. Os principais compradores são Rússia, Hong Kong, Ucrânia e Angola (RELATÓRIO ABIPECS, 2011).

Neste contexto, para que o mercado externo se mantenha em expansão, oferecendo produtos de elevada qualidade que garantam a saúde do consumidor, é imprescindível o controle de doenças no ambiente de criação de suínos, o que representa um desafio ao produtor, haja vista o potencial de transmissão de algumas delas e porque geralmente acarretam elevados prejuízos econômicos decorrentes de morte e refugo dos animais, perda de uniformidade dos lotes, maior predisposição às demais infecções (principalmente respiratórias) e custos com tratamento de suporte (ALFIERI et al., 1999a; PAHO, 2001).

Com relação a estas enfermidades, a diarreia está entre as mais frequentes na produção suinícola em todo o mundo (VANNUCCI; GUEDES, 2009). Trata-se de uma síndrome multifatorial que pode estar relacionada a agentes etiológicos como bactérias (*Escherichia coli, Clostridium perfringens* tipo C), protozoários e vírus (rotavírus, coronavírus e calicivírus) (ALFIERI et al., 1994; CALDERARO et al., 2001; WIELER et al., 2001) e ainda a fatores nutricionais, fisiológicos, alterações ambientais, imunidade e manejo, que cooperam para o agravamento dos quadros (DEWEY et al., 2003; ESTES; KAPIKIAN, 2007). A

semelhança do quadro clinico ocasionado por quaisquer destes agentes torna impossível a definição precisa da etiologia com base apenas na sintomatologia.

Dentre os agentes virais, os RVA são os principais envolvidos nas enterites antes e pós desmame em leitões (SAIF et al. 1994) e sua ampla disseminação nas criações, inclusive no Brasil, já foi demonstrada em diversos estudos (ALFIERI et al., 1999a; ALFIERI et al., 1999b; KHAMRIN et al., 2007; STEYER et al., 2007; GREGORI et al., 2009; LINARES et al., 2009). Considerando a frequência de ocorrência, os RVA desempenham um importante papel na epidemiologia da rotavirose suína, porém os RV dos grupos B e C também já foram descritos ocasionando diarreia em leitões nesta mesma etapa de criação, e ocorrem com maior frequência nesta espécie animal em comparação com outras (SAIF; JIANG, 1994; CHANG et al., 1997).

Os sinais clínicos da enterite causada por este agente consistem em diarreia de curta duração, geralmente dois a três dias, amarelo-esbranquiçada, de consistência pastosa a liquida, perda de peso em graus variáveis e desidratação severa (ALFIERI et al., 1999a; VANNUCCI; GUEDES, 2009). A excreção do vírus prolonga-se por 7 a 8 dias pós-infecção (ALFIERI et al., 1999a). A intensidade dos sinais, bem como as taxas de morbidade e mortalidade e a disseminação da doença, variam de acordo com alguns fatores tais como diferenças na virulência e/ou dose da cepa infectante, ocorrência de infecções secundárias, idade e condições imunitárias do hospedeiro, manejo da granja ou do ambiente onde o animal se encontra no que diz respeito à limpeza, número de animais por lote, desinfecção, umidade e ventilação, entre outras (MELIN et al., 2004).

2.1.2 Importância em Saúde Pública

Devido ao seu caráter zoonótico, os RVA causam grande impacto também na saúde pública, pois são os principais agentes virais envolvidos na gastroenterite infecciosa infantil em todo o mundo, sobretudo em países em desenvolvimento (PAHO, 2001; PARASHAR et al., 2003). Para se ter ideia, um estudo recente realizado por Tate et al. (2012) estimou que 453.000 crianças menores de 5 anos morrem, a cada ano, em decorrência de diarreia por

rotavírus, o que representa 37% dos óbitos relacionados à diarreia e 5% de todas as mortes nesta faixa etária.

Com efeito, nos países em desenvolvimento, as condições precárias de higiene e saneamento básico, bem como desnutrição e incidência de demais infecções imunossupressoras, contribuem para o agravamento da doença (JAIN et al., 2001; PARASHAR et al., 2003, 2006).

Ademais, destaca-se o papel que os animais desempenham como fontes de infecção para a transmissão do vírus, o que implica na diversificação genética e antigênica dos rotavírus humanos (COOK et al., 2004; MATTHIJNSSENS et al., 2006; MARTELLA et al., 2010).

2.2 Rotavírus

A primeira evidência da participação de rotavírus em quadros de diarreia foi descrita por Mebus et al. (1969), que na ocasião reproduziram a doença em bezerros inoculados experimentalmente com um filtrado (livre de bactérias) oriundo de material fecal de bezerros que apresentavam diarreia. Neste estudo, os autores identificaram partículas virais por meio de ME, as quais foram denominadas NCDV ("Nabraska Calf Diarrhea Vírus") (MEBUS et al., 1969).

Posteriormente, Bishop et al. (1973) detectaram os mesmos agentes, também por ME, em biópsias do epitélio duodenal de crianças com diarreia de natureza não bacteriana, e então Flewet et al. (1974) verificaram que as partículas virais presentes no material fecal de bezerros com quadro de diarreia, bem como de crianças com gastroenterite aguda eram morfologicamente indistinguíveis à ME.

Por fim, no ano de 1978, o ICTV (*International Comiteee on Taxonomy of Viruses*) propõe a criação do gênero *Rotavirus* como pertencente à família *Reoviridae* (MATTHEWS, 1979).

2.2.1 Características morfológicas e físico-químicas

Segundo o último relato do ICTV, os rotavírus são vírus não envelopados de RNA de fita dupla (dsRNA), pertencentes à família *Reoviridae*, subfamília Sedoreovirinae, constituídos por uma tripla camada de proteínas, com um diâmetro total de aproximadamente 100 nm e simetria icosaédrica. As partículas completas assemelham-se a uma roda radiada, daí a designação "rotavírus" (do latim *rota*, que significa "roda") (KING et al., 2012).

A camada mais interna (*core*) é constituída pelas proteínas VP1, VP2 e VP3, a intermediária pelo polipeptídio VP6, a qual serve de base para a classificação em grupos ou espécies virais de A a G, sendo o grupo A o mais prevalente tanto em humanos quanto em animais, e também em subgrupos (I, II, I e II, não-I e não-II) mediante emprego de anticorpos monoclonais. A camada mais externa é composta pelas proteínas VP4 e VP7, responsáveis pela indução de anticorpos neutralizantes e que definem os genotipos virais P e G, respectivamente, caracterizados pela técnica de RT-PCR (ESTES; KAPIKIAN, 2007; KING et al., 2012).

Com relação à infectividade, esta permanece viável em pH entre 3 e 9, é relativamente termoestável a 50°C e resistente a tratamentos com solventes como o éter e clorofórmio, ou detergentes não iônicos, o que reflete a ausência de envelope lipídico na partícula viral madura (ESTES; KAPIKIAN, 2007). No entanto, a infectividade é afetada por ciclos repetidos de congelamento e descongelamento, e o virion podem ser inativado por desinfetantes tais como fenol, formalina, cloro e betapropiolona (KAPIKIAN et al., 1988; CHEN et al., 1993), além do etanol a 95%, considerado como um dos desinfetantes mais eficazes porque remove o capsídeo externo (KING et al., 2012).

Como dito anteriormente, a ausência de envelope lipídico confere ao rotavírus uma elevada resistência às condições ambientais, o que associada à grande quantidade de partículas eliminadas pelos animais durante a fase aguda da diarreia – em torno de 10¹¹ partículas/mL de fezes (KOOPMANS; DUIZER, 2004) – faz-nos discorrer acerca da possibilidade de disseminação deste agente por meio de água e alimentos contaminados (HOPKINS et al., 1984) e efluentes não tratados, este último inclusive demonstrado por Nishida et al. (2009), que evidenciaram a eliminação de rotavírus no ambiente a partir dos

efluentes de criações de suínos, cujo manejo envolvia o despejo das excretas em solo direto, aterro e caixa de decantação com posterior destinação a agricultura. Segundo a WHO (2006), os rotavírus permanecem viáveis por aproximadamente 60 dias em esgoto comum, o que corrobora o exposto.

2.2.2 Genoma viral

Os RVA possuem um genoma constituído por 11 segmentos de dsRNA. A maioria destes codifica uma única proteína (monocistrônicos), neste caso seis proteínas estruturais (VPs) e seis proteínas não estruturais (NSPs). A exceção é o segmento 11 (bicistrônico) que possui uma segunda ORF, o que leva à expressão de outra proteína (NSP6), juntamente à NSP5 (ESTES; KAPIKIAN, 2007; MATTHIJNSSENS et al., 2011).

As partículas virais contêm suas próprias RNA-polimerases (RNA-dependente viral) para transcreverem os segmentos individuais de RNA em mRNA. A transcrição é assimétrica, sendo que cada segmento de RNA possui polaridade positiva, sintetizado a partir da fita negativa do RNA genômico (ESTES, 2001).

O sítio exato da transcrição no citoplasma não é conhecido. Os segmentos de RNA não apresentam sinal de poliadenilação e são ricos em adenina e uracila (58% a 67%). Eles contêm sequências comuns conservadas, denominadas consensuais, nas extremidades 5' e 3', ou seja, quase todos mRNA começam com uma sequência de consenso 5'- (GGCUUUUAAA...)-3' na extremidade 5' e terminam com uma de consenso 5'- (...AUGUGACC)-3' na extremidade 3'. Observa-se, contígua a tais regiões de ambas as extremidades dos diferentes segmentos, uma segunda região conservada, de pelo menos 30-40 nt, a qual é segmento-específica. Essas duas regiões de conservação constituem importantes sinalizadores que desencadeiam o processo de transcrição, replicação e seleção dos segmentos para o "empacotamento" no genoma viral (PATTON; SPENCER, 2000; ESTES, 2001; KING et al., 2012).

O *core* viral, que envolve o dsRNA, é composto por três proteínas, duas das quais estão diretamente associadas com o genoma (VP1 e VP3), enquanto a terceira (VP2) forma o capsídeo interno. Essas proteínas atuam no processo de transcrição e replicação do RNA, mais especificamente a VP1 desempenha a função de RNA polimerase, atuando como transcriptase e replicase viral, juntamente à VP2, sendo que apenas na presença desta a VP1 é ativada (KING et al., 2012). Com relação à VP3, estudos demonstraram que ela é responsável por se ligar às fitas de RNA de fita simples (ssRNA) e transportá-las para que sirvam de molde para a síntese das fitas de dsRNA (PATTON et al., 2007; KING et al., 2012).

O capsídeo intermediário é formado pela VP6, codificada pelo segmento 6, sendo ela o principal componente estrutural dos vírions, devido às suas interações com as proteínas do capsídeo externo (VP4 e VP7) e com a VP2. É hidrofóbica, altamente antigênica e imunogênica e, por conter epítopos comuns a todos os rotavírus dentro de um determinado grupo, ela serve de base para a classificação deles em grupos ou espécies virais de A a G, e também para a caracterização dos subgrupos (I e II), os quais são marcadores epidemiológicos importantes, já que as amostras ou pertencem ao subgrupo I ou ao II (ESTES; KAPIKIAN, 2007; MATTHIJNSSENS et al., 2008). Recentemente, uma nova espécie de rotavirus, denominada *"new adult diarrhea rotavirus"*, isolada de suínos, tem sido classificada como grupo H, de acordo com Matthijnssens et al. (2012).

As proteínas VP4 e VP7 formam o capsídeo externo (ESTES; KAPIKIAN, 2007). A VP4, também chamada de proteína de espícula, é codificada pelo segmento genômico 4 e contém um sitio de clivagem que ao ser ativado pela tripsina origina dois produtos, VP5* e VP8*, resultando no aumento da infectividade viral por aumentar a penetração do vírus nas células. Sabe-se ainda que esta proteína promova imunidade protetora tanto em humanos quanto em animais, pois está relacionada à indução de anticorpos neutralizantes (OFFIT; BLAVAT, 1986; ESTES; KAPIKIAN, 2007; KING et al., 2012). Já a VP7, uma glicoproteína codificada pelo segmento 9, é a segunda proteína mais abundante na estrutura do vírion, constituindo 30% deste, e juntamente à VP4, também induz a neutralização da partícula viral (ESTES; KAPIKIAN, 2007).

As proteínas não estruturais (NSPs) dos rotavírus desempenham funções relacionadas à replicação e morfogênese de novas partículas virais e evasão da resposta imune do hospedeiro (ESTES; KAPIKIAN, 2007).

A NSP1, codificada pelo segmento 5, é a mais variável de todas as NSPs e é considerada um fator de virulência (KING et al., 2012). Ela atua antagonizando a resposta imune inata do hospedeiro por induzir a degradação de intérferons, o que facilita a transmissão do vírus célula a célula (PATTON et al., 2007).

A NSP3 é codificada pelo segmento 7 e é responsável pela iniciação da tradução por se ligar simultaneamente à porção final 3" do mRNA viral e ao fator eucariótico de iniciação da tradução (eIF4G) (PIRON et al., 1999; VENDE et al., 2000).

A NSP4, codificada pelo segmento 10, desempenha um importante papel na morfogênese viral, isso porque atua como receptor para que as partículas virais imaturas (de dupla camada) passem do citoplasma para o retículo endoplasmático, onde adquirem um envelope transitório e a maturação é posteriormente finalizada (LOPEZ et al., 2005a; KING et al., 2012). Além disso, a NSP4 possui uma atividade de enterotoxina semelhante à observada na *Escherichia coli*, sendo por isso denominada peptídeo toxigênico (BALL et al., 2005).

2.2.5 NSP2, NSP5 e NSP6

A NSP2, codificada pelo segmento genômico 8 (1059 pb), é uma proteína de estrutura octamérica (Figura 1), expressa em altos níveis em células infectadas, composta por 317 aminoácidos e massa molecular de 35 kDa (SCHUCK et al., 2001). Ela desempenha diferentes atividades na replicação viral, como a de ligação não específica aos ssRNA para início da síntese de fitas de RNA (+), translocação do RNA viral durante o "empacotamento", atividade de helicase independente de ATP, atividade trifosfatase (NTPase), que remove o fosfato de qualquer NTP e, recentemente descrita, uma atividade NDP-quinase, ou seja,

transfere esses fosfatos resultantes de sua atividade NTPase para um substrato NDP e portanto, regenera os NTPs (TARAPOREWALA et al., 1999; SCHUCK et al., 2001; TARAPOREWALA; PATTON, 2001; BAR-MAGEN; SPENCER; PATTON, 2007; HU et al., 2012).

A hidrólise do NTP serve de fonte de energia para as atividades enzimáticas da NSP2 e para a translocação do ssRNA, a qual ocorre devido a mudanças conformacionais nos octâmeros desta proteína ao interagirem com os nucleotídeos, e na presença de magnésio e ATP, permitindo que ela "carregue" o RNA até o *core*. Por esse motivo, alguns autores atribuem à NSP2 a função de "motor molecular", ou seja, ela catalisa as demais reações enzimáticas (TARAPOREWALA et al., 1999; SCHUCK et al., 2001; KUMAR et al., 2007).

De acordo com Patton et al. (1993) e Hu et al. (2012), o domínio relacionado à ligação com o RNA é composto por 37 aminoácidos, cujos resíduos vão do 205 ao 241, enquanto as cisteínas dos resíduos 6, 8, 85 e 285 estão envolvidas com as pontes dissulfídicas, que garantem a estrutura octamérica da proteína. Segundo estes mesmos autores, as mudanças conformacionais que garantem à NSP2 a função de translocação do ssRNA ocorrem numa extensa região conservada de 75 bases (b) que incluem 35b na 5"-região não codificante-3" e mais as primeiras 30b da ORF.

Adicionalmente, Kumar et al. (2007) comprovaram que a atividade NTPase da NSP2 está relacionada ao aminoácido *histidina* na posição 225, altamente conservado, que funciona como um resíduo catalítico para esta função enzimática. Estes autores demonstraram que a mutação neste resíduo impede a síntese de dsRNA, porém sem afetar a formação dos viroplasmas.

Figura 1 – Viroplasmas detectados no citoplasma de células infectadas mediante imunofluorescência com antissoro específico para NSP2 (esquerda). A forma funcional da NSP2 é um octâmero formado a partir da interação entre dois tetrâmeros (direita).



Fonte: Adaptado de Patton et al. (2007).

A NSP5, codificada pelo segmento 11 (667 pb), é composta por 198 aminoácidos com alta proporção de serina (21%) e treonina (4,5%) e massa molecular de 21 kDa, formando uma estrutura dimérica. A NSP5 se liga ao dsRNA (VENDE et al., 2002) e também interage com a NSP2 e VP2, e sofre alterações pós-translacionais que incluem O-glicosilação e um complexo padrão de hiperfosforilação (AFRIKANOVA et al., 1998; BEROIS et al., 2003; EICHWALD et al., 2004b). Sotelo et al. (2010) identificaram *nove* locais de fosforilação nesta proteína, todos relacionados a resíduos de *serina*, nas seguintes posições no gene: 2, 4, 30, 37, 42, 56, 67, 101, 127, 163.

O segmento 11 também contém a sequência codificadora da NSP6, numa segunda ORF, cuja função ainda é pouco conhecida, mas que preliminarmente interage com a NSP5 nos processos de dimerização e hiperfosforilação. Porém, dados os baixos níveis de expressão da NSP6, sugere-se que ela não tenha um papel regulatório essencial (SAMANIEGO-HERNÁNDEZ et al., 2006).

Estas duas proteínas têm uma estreita interação e, curiosamente, Cao, Barro e Hoshino (2008), ao realizarem passagens seriais de rotavírus suínos em células da linhagem MA-104

conseguiram detectar três subpopulações com diferentes rearranjos gênicos. Numa delas, foi possível detectar, além de recombinação intragênica do gene NSP3, a inserção truncada do gene NSP2 dentro da NSP5, levando a um comportamento defectivo-interferente, ou seja, partículas virais que não possuem o genoma viral completo, mas que são capazes de infectar células. Seu ciclo de replicação depende, entretanto, da coinfecção com outras partículas completas.

Adicionalmente, sabe-se que NSP2 e NSP5 estão envolvidas na formação dos viroplasmas, que são estruturas citoplasmáticas de "montagem" formadas durante o ciclo de replicação, no interior das quais ocorre a replicação do genoma e a morfogênese de novas partículas virais (Figura 1). Neles estão contidas quatro proteínas estruturais (VP1, VP2, VP3, VP6) e as duas não estruturais, NSP2 e NSP5 (EICHWALD et al., 2004a; ESTES; KAPIKIAN, 2007; CARREÑO-TORRES et al., 2010).

De acordo com Fabbretti et al. (1999), o papel de NSP2 e NSP5 na formação dos viroplasmas é essencial, uma vez que ao serem coexpressas em células não infectadas formam estruturas semelhantes aos viroplasmas (VLS). Em contrapartida, Contin et al. (2010) demonstraram a possibilidade da formação dos VLS sob a coexpressão de NSP5 e VP2, apesar da ausência da NSP2, indicando um papel central da NSP5 neste processo. Campagna et al. (2005) e Lopez et al. (2005b) corroboram com esta hipótese ao comprovarem que a inibição da expressão da NSP5 mediante RNA de interferência resultou na formação de viroplasmas defeituosos, reduzida síntese viral, e decréscimo nos títulos de rotavírus.

Muito embora o significado biológico da hiperfosforilação da NSP5 no ciclo replicativo dos rotavírus não seja muito bem esclarecido ainda, alguns autores afirmam que a NSP2 tem papel fundamental neste processo, por induzir mudanças conformacionais nos dímeros de NSP5 de modo a expor seus alvos para a atividade da quinase celular 1 (CK1) e/ou atividade de auto-quinase, mais especificamente relacionadas ao resíduo de *serina* da região 67 (Ser67) (AFRIKANOVA et al., 1998; EICHWALD et al., 2002, 2004b). No entanto, estudos posteriores confrontaram essa hipótese ao demonstrarem que mesmo em casos de mutação da Ser67 por outro aminoácido, por exemplo, alanina, a NSP5 mutante foi capaz de sofrer fosforilação e ainda esclarecem que a NSP2, na verdade, atua como um potencializador da fosforilação, devido à sua atividade triposfatase, mas que não se faz imprescindível para tal (SEN; AGRESTI; MACKOW, 2006; SEN; SEN; MACKOW, 2007;

BAR-MAGEN; SPENCER; PATTON, 2007). Nota-se que a fosforilação da NSP5 parece não ter relação com a formação dos viroplasmas (CARPIO et al., 2004).

2.2.6 Evolução viral

A diversidade genética observada nos rotavírus está associada a diferentes mecanismos de evolução que consistem em mutações pontuais ("drifts"), rearranjos ("rearrangements"), reestruturações ("shifts" ou "reassortants") (TANIGUCHI; URASAWA, 1995) e recombinações intragênicas (PARRA et al., 2004).

Nas mutações pontuais ocorrem substituições de bases, as quais são detectadas por meio de sequenciamento de nucleotídeos (FLORES et al., 1988). O contato com o sistema imune do hospedeiro promove uma pressão de seleção por parte dos rotavírus, ocasionando tais mutações (TANIGUCHI; URASAWA, 1995). Por esse motivo, este mecanismo é frequentemente observado nos genes codificadores das proteínas de superfície VP4 e VP7, por estarem diretamente em contato com os anticorpos neutralizantes (TANIGUCHI; URASAWA, 1995).

O rearranjo ou "rearrangement" caracteriza-se por alterações nos trechos de uma sequência dentro de um único segmento genômico, que podem ocorrer na forma de deleções ou, mais frequentemente, como duplicações. Já foi observado nos segmentos (S) 5, 6, 8, 10 e 11 dos RVA, porém mais frequentemente nos S5 e S11 (TANIGUCHI; URASAWA, 1995). À Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (PAGE), essas alterações mostram-se quando há ausência de alguns segmentos a partir da sua posição normal ou bandas adicionais mais lentas (TANIGUCHI; URASAWA, 1995).

Desselberger (1996) explica que os rearranjos ocorrem provavelmente devido a uma falha da RNA polimerase no momento da transcrição, fazendo com que esta enzima retorne aleatoriamente à fita molde, reiniciando a transcrição. De acordo com Patton et al. (2007), a região codificadora do gene não é afetada, pois geralmente as duplicações acontecem imediatamente após o códon terminal, o que faz com que a ORF seja mantida e, então, a

proteína viral codificada pelo segmento rearranjado seja similar à produzida pelo segmento normal.

Vírus com tais rearranjos foram primeiramente detectados em crianças imunossuprimidas e cronicamente infectadas (PEDLEY et al., 1984; HUNDLEY et al, 1987). Em animais, há casos relatados em suínos (MATTION et al., 1988), coelhos (GORZIGLIA et al., 1989) e bovinos (HUNDLEY et al., 1985), este último obtido *in vitro* após várias passagens em cultivo celular.

Outro mecanismo de evolução é o "reassortment" ou reestruturação, restrito aos vírus que possuem o genoma segmentado, como é o caso dos rotavírus, e ocorre quando as células são coinfectadas com diferentes cepas do vírus, pertencentes ao mesmo grupo, o que leva ao compartilhamento de segmentos entre eles e o consequente "empacotamento" de novas e diversas combinações gênicas (TANIGUCHI; URASAWA, 1995; SIMON-LORIERE; HOLMES, 2011).

A vantagem do "reassortment" para os rotavírus tem a ver com o fato de eles não serem naturalmente capazes de atravessar a barreira interespécies e então infectar ou disseminar-se eficientemente no hospedeiro heterólogo (TANIGUCHI; URASAWA, 1995; MARTELLA et al., 2010). Em outras palavras, o "reassortment" de amostras de animais com as de humanos gera vírus que compartilham segmentos de RNA de ambos, e desta forma, possuem uma chance maior de se difundirem em uma nova população (MARTELLA et al., 2010).

Há ainda a recombinação intragênica, que consiste na troca de fragmentos entre duas sequências gênicas pertencentes a um mesmo genotipo, diferentemente do "reassortant", em que todo o segmento é trocado. Foi relatada primeiramente por Parra e colaboradores, em 2004, segundo os quais tal evento geraria vírus quiméricos, capazes de se esquivar do sistema imune do hospedeiro, hipótese também sugerida por Simon-Loriere e Holmes (2011).

Os rotavírus infectam as células absortivas diferenciadas (enterócitos maduros) localizadas no terço apical das vilosidades do intestino delgado, e a replicação ocorre no citoplasma destas células (ESTES, 2001).

O ciclo se inicia com a adsorção do vírus à célula, o que envolve a clivagem da VP4, por ação da tripsina, em seus produtos VP8* e VP5*, os quais promovem uma penetração mais rápida, embora não se saiba o mecanismo exato deste efeito. No entanto, há evidências que apontam uma interação destas proteínas virais com as de superfície celulares, mais especificamente da VP5* e VP7 com as integrinas. Há duas formas possíveis pelas quais o vírion adentra a célula: penetração direta pela membrana plasmática ou endocitose. Acreditase que a primeira seja mediada pela região hidrofóbica da VP5*, ou seja, vírions cuja proteína de espícula não tenha sido clivada, não serão capazes de penetrar por este mecanismo (CARTER; SAUNDERS, 2007; KING et al., 2012).

Após entrada no citoplasma da célula, os virions perdem seu capsídeo externo (VP4 e VP7), transformando-se em partículas de dupla camada, a partir das quais se iniciam as etapas de transcrição, tradução, replicação e maturação viral (CARTER; SAUNDERS, 2007). Primeiramente, os RNA"s são transcritos pela RNA polimerase RNA-dependente (VP1), levando à produção de RNA (+) a partir da fita negativa (-). Destes RNA (+) recémsintetizados, uma parte atua como mRNA, dando inicio à síntese das proteínas virais e, em seguida, a formação dos viroplasmas por ação da NSP2 e NSP5, com subsequente acúmulo de VP1, VP2 e VP3 no interior dos mesmos, formando então o *core*. Enquanto isso, os demais RNA (+) adentram no *core* recém-formado para servirem de molde para a síntese dos RNA (-), novamente por ação da VP1 como RNA polimerase, levando assim à formação das fitas duplas de RNA no vírion. Nesta fase, um rigoroso processo de seleção assegura que cada *core* receba um de cada dos 11 segmentos de RNA. Em seguida, a VP6 é adicionada ao *core* para formar a segunda camada do capsídeo, resultando numa estrutura de dupla camada semelhante àquela derivada do vírion infectante (KAPIKIAN et al., 2001; CARTER; SAUNDERS, 2007; PATTON et al., 2007).

A fase final de replicação ocorre no interior das partículas de dupla camada recémformadas (PDC), porém, diferentemente dos transcritos iniciais, estes não possuem o "cap" (CARTER; SAUNDERS, 2007).

As PDC deixam o viroplasma e se ligam à NSP4, que por sua vez é sintetizada no RE juntamente com a VP7, onde permanecem localizadas na membrana. Neste ínterim, a NSP4 se liga também à VP4. O complexo PDC + NSP4 + VP4 adentra o RE por brotamento, onde recebe um envelope temporário semelhante a uma vesícula, contendo a VP7. O processo de maturação culmina com a formação do capsídeo externo e desaparecimento deste envoltório lipídico. Por fim, os vírions são liberados da célula por lise ou exocitose (CARTER; SAUNDERS, 2007; PATTON et al., 2007).

2.2.8 Genotipos

Tradicionalmente, as amostras positivas para RVA são classificadas com base em suas duas proteínas do capsídeo externo (VP4 e VP7), as quais induzem a formação de anticorpos neutralizantes (ESTES; KAPIKIAN, 2007; KING et al., 2012), sendo que a VP7 determina o genotipo G, por se tratar de uma Glicoproteína, enquanto a VP4 determina o genotipo P, por ser Protease-sensível. Assim sendo, foram identificados até o momento 35 genotipos P e 27 genotipos G (MATTHIJNSSENS et al., 2011). No entanto, recentemente foi proposta uma nova classificação para os rotavírus que leva em consideração todos os 11 segmentos genômicos, permitindo uma melhor compreensão das relações evolucionárias entre as espécies (MATTHIJNSSENS et al., 2011).

Em humanos, os genotipos G e P mais importantes epidemiologicamente são G1 a G4 e P[4] ou P[8], sendo que seis combinações têm sido frequentemente relacionadas aos casos de doença, a saber, G1P[8], G2P[4], G3[P8], G4[P8], G9[P8] e G12[P8] (GENTSCH et al., 1996; KHAMRIN et al., 2010; ZELLER et al., 2012), porém outras já foram relatadas, tais como G9P[6] na Índia (RAMACHANDRAN et al., 1996), G8P[6] em Malawi (CUNLIFFE et al., 1999) e G5P[8] no Brasil (ALFIERI et al., 1996).

Em bovinos, os genotipos mais comuns são G6, G8 e G10, associados com P[1], P[5] ou P[11] (FUKAI et al. 1999; GHOSH et al. 2008), e também já foram descritos genotipos tipicamente humanos (G1, G2 e G3) e suínos (G11) (HUSSEIN et al., 1993; SILVA et al., 2012).

No caso dos suínos, G3, G4, G5, G6 e G11 são os genotipos mais relatados, associados com P[6] ou P[7] (GOUVEA et al., 1994; PARRA et al. 2008; GREGORI et al., 2009). Cabe ressaltar que G3, G5, G6 e G8 são compartilhados por humanos e animais (DESSELBERGER et al., 2001; MATTHIJNSSENS et al., 2006), por exemplo o G5 que já foi detectado em crianças com diarreia (ALFIERI et al., 1996; CARMONA et al., 2004), bem como em suínos (BARREIROS et al., 2003).

No tocante às proteínas não estruturais 2 e 5, de acordo com a nova classificação de Matthijnssens et al. (2011), seus genotipos são representados pelas letras N e H, respectivamente. Desta forma, a NSP2 possui nove genotipos (N1 ao N9) e a NSP5, 11 (H1 ao H11), sendo que em humanos já foram descritos os genotipos N1, N2, N3 e H1, H2 e H3, e em suínos N1 e H1 (MARTELLA et al., 2010; MATTHIJNSSENS et al., 2011). Como observado para VP4 e VP7, essas proteínas também compartilham genotipos entre humanos e animais, tal como relatado por Matthijnssens et al. (2006), Tsugawa e Hoshino (2008), Khamrin et al. (2010) e Martella et al. (2010).

Como exemplo, um estudo realizado por Esona et al. (2009) demonstrou que em seis amostras africanas pertencentes ao genotipo G8, os genes VP7, NSP2, e NSP5 tiveram alta identidade com amostras animais (entre 83-99% e 97-99%, nucleotídica e de aminoácidos, respectivamente) (ESONA et al., 2009). Segundo estes mesmos autores, o estudo apresenta evidências para a hipótese de que há uma interação dinâmica entre os rotavírus de origem humana e animal, onde provavelmente os genes NSP2 e NSP5 sejam oriundos de uma introdução zoonótica.

Ghosh et al. (2007) caracterizaram uma amostra bovina pertencente ao genotipo G3P[3] proveniente da região oriental da Índia, através do sequenciamento das regiões codificadoras da VP6, NSP4 e NSP5, e constataram que a mesma teria sido originada a partir de múltiplos eventos de reestruturações envolvendo rotavírus de origem bovina e símia. No

que diz respeito à NSP5, ela apresentou 95% de identidade em termos de aminoácidos com a amostra padrão bovina RF.

Já em suínos, Ghosh et al. (2010) definiram a sequência nucleotídica dos genes codificadores da VP1, VP2, VP3, e NSP1, NSP2 e NSP3 da amostra RU172 e, quanto à NSP2, tal amostra agrupou-se num grupo predominantemente composto por rotavírus humanos.

Khamrin et al. (2009) ao estudarem uma amostra não usual de rotavírus, G3P[10] de uma criança de 2 anos hospitalizada na Tailândia, observaram que o gene NSP5 desta amostra estava filogeneticamente relacionado a uma outra amostra humana que havia circulado neste mesmo país há 11 anos, com genotipo G12P[9].

No Brasil, merece destaque o estudo pioneiro de Medici et al. (2010) ao analisarem a diversidade molecular do gene codificador da NSP2, no qual foi possível concluir que houve a segregação num cluster único de três amostras suínas pertencentes ao grupo B dos rotavírus, tendo os valores de identidade nucleotídica variado de 90.4% a 91.8% entre si.
3 OBJETIVOS

Considerando o impacto econômico das rotaviroses para a suinocultura e a importância do monitoramento deste agente infeccioso, os objetivos deste trabalho consistiram em:

 Caracterizar os genes codificadores da NSP2 e NSP5 presentes em amostras fecais suínas positivas para rotavírus mediante a técnica de RT-PCR e pela determinação de suas sequências nucleotídicas.

• Analisar a diversidade gênica encontrada, no escopo da epidemiologia da doença em animais e humanos, com base nas análises filogenéticas.

• Contribuir para o entendimento e prevenção das rotaviroses bem como suas possíveis relações zoonóticas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostras

Foram testadas 63 amostras fecais de leitões na fase de maternidade, com idade até 34 dias, com e sem diarreia, e colhidas durante os anos de 2011 e 2012. As amostras eram provenientes de seis criações localizadas em municípios do Estado de São Paulo, a saber, Limeira, Pereiras, Holambra, Cunha, Fartura e Bragança Paulista. No momento da colheita, apenas a granja localizada no município de Bragança Paulista utilizava vacinação contra o rotavírus do grupo A como método de profilaxia.

Essas amostras foram submetidas à triagem quanto à presença de rotavírus por meio da técnica de *nested*-PCR, conforme descrito por Salem et al. (2010).

Utilizou-se a amostra NCDV de rotavírus como padrão positivo nas reações de detecção viral. Para controle negativo foi utilizada água previamente tratada com DEPC, na proporção de um controle negativo intercalado a cada cinco amostras.

4.2 Diagnóstico de rotavírus

O diagnóstico de rotavírus suíno foi realizado utilizando-se uma reação de transcrição reversa seguida por reações em cadeia pela polimerase (RT-PCR) dirigidas à amplificação de um segmento de 975 pb, codificador da NSP2 e outro de 667 pb, codificador tanto da NSP5 quanto da NSP6.

Com relação à amplificação da NSP2, os primers (oligonucleotídeos iniciadores) sugeridos por Matthijnssens et al. (2006) foram submetidos a uma análise *in silico* para se observar se havia identidade com os sítios de hibridização. Para isso, várias sequências nucleotídicas acerca do gene codificador da NSP2 de rotavírus suínos e bovinos foram

recuperadas do GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide), e alinhadas mediante o uso do software Clustal W v. 1.8.3.

Ao se observar visualmente os alinhamentos nucleotídicos, junto ao programa Bioedit v.7.0.9 (HALL, 1999), constatou-se que o primer senso apresentou identidade próxima ou igual a 100% ao longo de todas as amostras (dados não mostrados), fato este que não ocorreu com o primer antissenso. Com base nisto, optou-se pelo desenho de novos primers, mantendo, porém, o primer senso, e ainda pela fragmentação do gene da NSP2 em duas partes, visando otimizar o sequenciamento deste, posteriormente. Assim, três novos primers foram desenhados, levando-se em consideração o fato de assegurar compatibilidade com o senso, mediante a definição de uma área consensual e também dos parâmetros de temperatura de anelamento (Tm, % GC) e análise de "hairpins", dímeros ("self-dimer" e "cross-dimer"), sequências palíndromas e repetições de um mesmo nucleotídeo ("runs"), avaliados por meio do aplicativo on-line Netprimer (http://www.premierbiosoft.com/netprimer/index.html).

Com relação à amplificação de NSP5/6, o par de *primers* sugerido por Matthijnssens et al. (2006) foi submetido ao mesmo processo de teste *in silico*, e ambos apresentaram identidade próxima ou igual a 100% ao longo de todas as amostras (dados não mostrados).

Portanto, para amplificação da NSP2 foram utilizados os primers GEN-NSP2F (MATTHIJNSSENS et al., 2006) e NSP2RW707 para a primeira porção do gene, e NSP2FW707 e NSP2RW975 para a segunda, contemplando uma região de 975 pb, ao total. Já para amplificação da NSP5/6 utilizou-se os primers GEN-NSP5F e GEN-NSP5R (MATTHIJNSSENS et al., 2006), para uma região de 667 pb (Quadro 1).

| Primer | Sequência (5'→3') | Amplicon (pb) | Referência |
|------------|------------------------|---------------|-------------------------------|
| GEN-NSP2F | GGCTTTTAAAGCGTCTCAG | 729 | Matthijnssens et al., 2006 |
| NSP2-RW707 | GTACCATTTCCAGTGATRTCTC | /20 | Desenhado neste estudo |
| NSP2-FW707 | CATGGTAAAGGTCACTAYAGAG | 247 | Desenhados neste |
| NSP2-RW975 | ACAGTTGACTATCTTTYTACCT | 241 | estudo |
| GEN-NSP5F | GGCTTTTAAAGCGCTACAG | 667 | Matthijnssens et al., |
| GEN-NSP5R | GGTCACAAAACGGGAGT | 007 | 2006 |

Quadro 1 – Descrição dos primers utilizados no presente estudo, dirigidos aos genes da NSP2 e NSP5, para detecção de rotavírus suíno - São Paulo - 2013

Fonte: Barbosa (2013)

4.3 Extração de RNA

A extração de RNA viral consistiu em preparar suspensões das amostras fecais a 50% (p/v) em água tratada com DEPC (InvitrogenTM) e posteriormente clarificá-las por centrifugação a 12.000 g por 15 minutos a 4°C, tomando-se o sobrenadante como amostra.

Em seguida, homogeneizaram-se 750 μ L de Trizol® e 250 μ L de suspensão de amostra, incubando-se por 5 minutos à temperatura ambiente. Depois, adicionaram-se 200 μ L de clorofórmio, homogeneizando em vórtex, incubando-se por 10 minutos na centrífuga refrigerada (4°C). Centrifugou-se a 12.000 g por 15 minutos a 4°C e transferiu-se a fase aquosa para outro tubo previamente identificado, com uso de pipeta.

Na próxima etapa, adicionaram-se 500 μ L de álcool isopropílico e incubou-se por 15 minutos em freezer a -20°C, homogeneizando com vórtex em seguida, e centrifugou-se a 12.000 g por 15 minutos a 4°C. Feito isso, desprezou-se o sobrenadante, vertendo o tubo pelo lado oposto ao que foi centrifugado. Após, foram adicionados 950 μ L de etanol a 75%, homogeneizando manualmente. Centrifugou-se a 12000 g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi desprezado. O sedimento foi seco mantendo-se o tubo em banho-maria seco

a 56°C, adicionando-se, em seguida, 25 μ L de água ultrapura previamente tratada com DEPC (InvitrogenTM).

Por fim, o tubo foi incubado a 56°C por 10 minutos e conservado a -20°C até o momento do uso.

4.4 RT - PCR

A partir do RNA extraído, procedeu-se a reação de transcrição reversa (RT) para síntese de DNA complementar (cDNA), utilizando-se primers randômicos (InvitrogenTM Cat. No. 48190-011).

Para tal, 7 µL do RNA extraído (item 4.3) foram submetidos a 95°C durante 5 minutos para desnaturação e, em seguida, mantidos 10 minutos em gelo. Ao mesmo foi adicionado o mix de RT, que por sua vez era composto por 1x First Strand Buffer (InvitrogenTM), 1 mM de cada dNTP, 10 mM DTT, 1 µL de Random Hexamers (50 ng/µL - InvitrogenTM Cat. No. 48190-011), 200 U MMLV Reverse Transcriptase (InvitrogenTM) e água previamente tratada com DEPC q.s.p. 20 µL. A RT foi realizada a 37°C por 1 hora e a 70°C por 15 minutos em termociclador.

A seguir, para realização da PCR, um volume de 5 μ L de cDNA foi adicionado ao mix de PCR, que por sua vez era composto por 1 x PCR Buffer (InvitrogenTM), 0,2 mM de cada dNTP, 0,2 μ M de cada primer GEN-NSP2F, NSP2RW707, NSP2FW707 e NSP2-RW975 (para NSP2) ou GEN-NSP5F e GEN-NSP5R (para NSP5/6) (Quadro 1), 2 mM MgCl₂, 5U de Taq DNA Polymerase (InvitrogenTM) e água ultrapura previamente tratada com DEPC q.s.p. 25 μ L, submetendo-os aos seguintes ciclos de temperatura/tempo: um ciclo de 94^oC/3 minutos, 40 ciclos de amplificação (94^oC/45 segundos, 45^oC/45 segundos, e 70^oC/2,5 minutos) seguidos por uma extensão final de 70^oC por 7 minutos.

Por fim, 10 μ L de cada produto amplificado foram analisados mediante eletroforese em gel de agarose a 1,5 % (p/v) em tampão TRIS-borato 0,045M; EDTA 0,001M pH 8,0, e corados com brometo de etídio a 0,5 μ g/mL, sendo consideradas positivas as amostras que apresentaram fragmento de 975 pb para NSP2 e 667 pb para NSP5/6, tendo como referência DNA ladder de 100 pb (Invitrogen[™]).

4.5 Sequenciamento de DNA

Os *amplicons* com fragmentos de tamanho compatível (item 4.4) foram purificados com ExoSAP-ITTM, de acordo com as instruções do fabricante (GE Heathcare).

Em seguida, procedeu-se à reação de sequenciamento bidirecional de DNA em sequenciador automático ABI-3500 (Applied BiosystemsTM). A reação para cada amostra consistiu em dois diferentes tubos, contendo cada um deles 2 μ L de BigDye 3.1 (Applied BiosystemsTM), 1,5 μ L de tampão de sequenciamento, 5 μ M de cada primer senso ou antisenso e 6,0 μ L do DNA alvo para uma reação final com volume de 10 μ L, sendo submetidos a 40 ciclos de 96°C por 1 minuto, 50 °C por 15 segundos, 60°C por 4 minutos, com rampa de 1°C por segundo em todas as etapas.

A seguir, com o intuito de se removerem os terminadores não incorporados ao DNA, utilizou-se BigDye XTerminator[™], segundo o protocolo fornecido pelo fabricante. Por fim, as amostras foram levadas ao sequenciador de nucleotídeos para processamento de acordo com as instruções do fabricante.

4.6 Análise das sequências

De posse dos cromatogramas, foi feita uma inspeção visual das sequências geradas para cada fita senso e antissenso por meio do aplicativo FinchTv v. 1.4.0 (©2011, Geospiza). Após isso, elas foram editadas com o programa Bioedit v.7.0.9 (HALL, 1999) para uma busca por discrepâncias entre cada uma das fitas sequenciadas e, em seguida foram alinhadas entre si e com outras homólogas recuperadas do Genbank, utilizando-se o software Clustal W versão 1.8.3 no mesmo programa (THOMPSON et al., 1994), visando a análise filogenética.

As sequências de NSP2, NSP5 e NSP6 recuperadas do Genbank utilizadas nesta etapa estão apresentadas nos quadros 2a, 2b e 2c, respectivamente. Buscou-se contemplar representantes de todos os genotipos descritos para tais proteínas, de acordo com Matthijnssens et al. (2011).

| continu | | | | | | |
|------------------|----------|------------|--|--|--|--|
| Número de acesso | Genotipo | Hospedeiro | | | | |
| EF560709 | N1 | humano | | | | |
| EF672587 | N1 | humano | | | | |
| GU296412 | N1 | humano | | | | |
| EF672615 | N1 | humano | | | | |
| JQ713649 | N1 | humano | | | | |
| GU199489 | N1 | suíno | | | | |
| EF990688 | N1 | suíno | | | | |
| GU199195 | N1 | suíno | | | | |
| EF990696 | N1 | suíno | | | | |
| GU199517 | N1 | suíno | | | | |
| DQ494401 | N1 | bovino | | | | |
| DQ494402 | N1 | bovino | | | | |
| GU827413 | N1 | felino | | | | |
| AY787648 | N2 | humano | | | | |
| DQ005107 | N2 | humano | | | | |
| EF554111 | N2 | humano | | | | |
| HQ650123 | N2 | humano | | | | |
| EF990704 | N2 | bovino | | | | |
| EF990700 | N2 | bovino | | | | |
| FJ347118 | N2 | bovino | | | | |
| JF693044 | N2 | bovino | | | | |
| EF554155 | N2 | ovino | | | | |
| JF712584 | N2 | cavalo | | | | |
| EU708952 | N2 | felino | | | | |
| DQ490534 | N3 | humano | | | | |
| DQ146703 | N3 | humano | | | | |
| AB009625 | N4 | ave | | | | |
| DQ838615 | N5 | simio | | | | |
| DQ838613 | N5 | simio | | | | |
| DQ838614 | N5 | simio | | | | |
| DQ838612 | N5 | simio | | | | |
| DQ838611 | N5 | simio | | | | |
| FJ169860 | N6 | ave | | | | |

Quadro 2a – Sequências do gene NSP2 de rotavírus recuperadas do GenBank utilizadas para a reconstrução da genealogia, segundo número de acesso, genotipo da amostra e hospedeiro - São Paulo - 2013

Quadro 2a – Sequências do gene NSP2 de rotavírus recuperadas do GenBank utilizadas para a reconstrução da genealogia, segundo número de acesso, genotipo da amostra e hospedeiro - São Paulo - 2013

| | | conclusão |
|------------------|----------|------------|
| Número de acesso | Genotipo | Hospedeiro |
| GQ479954 | N7 | rato |
| GU983677 | N8 | morcego |
| JF712562 | N9 | equino |

Quadro 2b – Sequências do gene NSP5 de rotavírus recuperadas do GenBank utilizadas para a reconstrução da genealogia, segundo número de acesso, genotipo da amostra e hospedeiro - São Paulo - 2013

| | | continua |
|------------------|----------|------------|
| Número de acesso | Genotipo | Hospedeiro |
| EF672618 | H1 | humano |
| EF560712 | H1 | humano |
| EF672590 | H1 | humano |
| DQ146698 | H1 | humano |
| DQ146681 | H1 | humano |
| GU199491 | H1 | suíno |
| DQ916134 | H1 | suíno |
| EF990690 | H1 | suíno |
| EF990698 | H1 | suíno |
| DQ204739 | H1 | suíno |
| DQ494399 | H1 | bovino |
| DQ494400 | H1 | bovino |
| AY787651 | H2 | humano |
| EF554092 | H2 | humano |
| DQ005104 | H2 | humano |
| EF672562 | H2 | humano |
| HM467919 | H2 | humano |
| AB091727 | H2 | bovino |
| EF185863 | H2 | bovino |
| EF554114 | H3 | humano |
| EF554103 | Н3 | humano |
| EF554136 | Н3 | humano |
| EF990706 | H3 | bovino |
| AF188126 | H3 | bovino |
| EF990702 | H3 | bovino |
| GU384198 | Н3 | bovino |
| EF554158 | H3 | ovino |
| GU937887 | H3 | caprino |
| AB009628 | H4 | ave |
| EU486980 | H4 | ave |

Quadro 2b – Sequências do gene NSP5 de rotavírus recuperadas do GenBank utilizadas para a reconstrução da genealogia, segundo número de acesso, genotipo da amostra e hospedeiro - São Paulo – 2013

| | | conclusão |
|------------------|----------|------------|
| Número de acesso | Genotipo | Hospedeiro |
| HM627563 | H5 | humano |
| DQ838627 | H5 | símio |
| DQ838628 | H5 | símio |
| DQ838629 | H5 | símio |
| DQ146706 | H6 | humano |
| EU636934 | H6 | simio |
| EU708955 | H6 | felino |
| EU708922 | H6 | canino |
| JF712587 | H7 | equino |
| JF712576 | H7 | equino |
| EU486984 | H8 | ave |
| FJ169863 | H8 | ave |
| GU983680 | H10 | morcego |

Quadro 2c – Sequências do gene NSP6 de rotavírus recuperadas do GenBank utilizadas para a determinação da identidade nucleotídica e de aminoácidos, segundo número de acesso e hospedeiro - São Paulo - 2013

| | continua |
|------------------|------------|
| Número de acesso | Hospedeiro |
| HM773820 | humano |
| HM773798 | humano |
| HM773776 | humano |
| HM773754 | humano |
| HM773732 | humano |
| HM773710 | humano |
| JN258837 | humano |
| EF672618 | humano |
| JF796722 | suíno |
| JF796700 | suíno |
| JF796733 | suíno |
| DQ916134 | suíno |
| AY769694 | humano |
| AY787651 | humano |
| EF185863 | humano |
| EF672569 | humano |
| EF672611 | humano |
| DQ838627 | símio |
| DQ838628 | símio |
| DQ838629 | símio |

Quadro 2c – Sequências do gene NSP6 de rotavírus recuperadas do GenBank utilizadas para a determinação da identidade nucleotídica e de aminoácidos, segundo número de acesso e hospedeiro - São Paulo – 2013

| | conclusa |
|------------------|------------|
| Número de acesso | Hospedeiro |
| JF791805 | simio |
| AF306493 | simio |
| DQ146706 | humano |

Foi definido um bloco consensual de análise para serem feitas as matrizes de identidade nucleotídica e de aminoácidos entre as amostras, mediante o software Bioedit v.7.0.9 (HALL, 1999).

Para realizar a inferência filogenética, utilizou-se o programa Mega versão 5.05 (TAMURA et al., 2011) e a árvore gerada a partir das sequências nucleotídicas foi construída empregando-se o método de "neighbor-joining", com modelo de substituição nucleotídica "maximum composite likelihood". Cada ramo foi aferido com procedimento estatístico de 'Bootstrap', utilizando-se 1000 repetições, sendo os valores maiores ou iguais a 70 apresentados próximos aos nós.

5 RESULTADOS

5.1 Reações de RT-PCR visando os genes codificadores das NSP2, NSP5 e NSP6

Das 63 amostras fecais diarreicas de suínos, submetidas à triagem por meio de PCR com os primers descritos por Salem et al. (2010), 17 delas (17/63 ou 27%) apresentaram-se positivas para a presença de rotavírus, provenientes de cinco municípios diferentes.

Destas, foi possível amplificar o fragmento parcial do gene codificador da NSP2 e o segmento completo do gene codificador da NSP5/6 em nove delas (9/17 ou 53%), com os primers desenhados neste estudo e os descritos por Matthijnssens et al. (2006) (item 4.2).

Todas as nove amostras positivas, inclusive o padrão de rotavírus NCDV, apresentaram ao gel de agarose, nas condições previamente descritas, uma única banda de 975 pb (NSP2) e 667 pb (NSP5/6). Os controles negativos empregados nas reações não evidenciaram quaisquer bandas à visualização do gel.

5.2 Reação de sequenciamento nucleotídico

Para a NSP2, foi possível obter as sequências de apenas sete das nove amostras positivas (amostras SWRV1 à SWRV7), para as quais o gene codificador desta proteína foi definido parcialmente (97% do gene).

Já para a NSP5/6, foram obtidas as sequências de seis das nove amostras positivas (amostras SWRV1 à SWRV6), as quais tiveram o gene codificador desta proteína completamente definido. A amostra SWRV7 não foi utilizada nas análises subsequentes para NSP5/6 em função de seu reduzido comprimento (157 pb) ao sequenciamento (Apêndice A).

A identificação das amostras, origem, tamanho dos fragmentos sequenciados e número de acesso GenBank encontram-se no quadro 3.

| Amostra | Origem | Fragmento Sequenciado (NSP2/NSP5) | Número de acesso (NSP2) | Número de acesso (NSP5) |
|---------|-------------|---|----------------------------|----------------------------|
| SWRV1 | Pereiras/SP | 974/651 | KC117140 | KC117147 |
| SWRV2 | Pereiras/SP | 965/619 | KC117141 | KC117148 |
| SWRV3 | Holambra/SP | 965/645 | KC117142 | KC117149 |
| SWRV4 | Cunha/SP | 955/664 | KC117143 | KC117150 |
| SWRV5 | Cunha/SP | 965/664 | KC117144 | KC117151 |
| SWRV6 | Fartura/SP | 971/664 | KC117145 | KC117152 |
| SWRV7 | Fartura/SP | 964/157 | KC117146 | * |

Quadro 3 – Relação dos municípios de origem das amostras, tamanho dos fragmentos dos genes sequenciados e número de acesso GenBank - São Paulo - 2013

Nota: (*) depósito Genbank não realizado em função do comprimento insuficiente do fragmento (157pb) Fonte: Barbosa (2013)

5.3 Alinhamento das sequências geradas

Na figura 2 encontra-se representado o alinhamento de nucleotídeos do gene codificador da NSP2 referente às amostras geradas no presente estudo, identificadas de SWRV1 a SWRV7, tomando-se como referência a amostra Gottfried (número de acesso GU199489).

| | | | | | | | | | cont | inua |
|--------------------|---------------------------------------|---------------------|------------------------------|--------------------------|---------------------------------------|-----------------------|----------------------------|---------------------------------------|------------------------------|----------|
| | 10 | 20 . | 30 | 40 | 50 • • • • • • • • | 60 •••• | 70 | 80 • • • • • • • • | 90 . | 100 |
| Gottiried SWRV1 | GCTTTTAAAGCGTC | TCAGTCGCCGTT | TGAGCCTTU | CGGTGTAGCC | ATGGCTGAG | TAUCTTUCTI | TTETTATCCI | CATTTGGAGA | ACGATAGCTAT | AAAT |
| SWRV2 | · · · · · · · · · · · · · · · · · · · | •••••• | ••••• | •••••• | ••••• | | | ····· | ••••• | •••• |
| SWRV3 SWRV4 | ~~~~~~ | ~~~ | | | | | | A | | |
| SWRV 5 | · · · · · · · · · · · · · · · · · · · | | | •••••• | | | | A | | |
| SWRV6 SWRV7 | ~~ | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | |
| | 110 | 120 | 130 | 140 | 150 | 160 | 170 | 180 | 190 | 200 |
| Gottfried | TTATTCCTTTTAAT | AGTTTGGCAATA | AAATGTAT | GTTGACAGCAA | AAGTAGATA | AAAGGATCAA | GATAAATTT | ATAACTCAAT | TGTTTACGGAA | TTGC |
| SWRV1 SWRV2 | ••••• | .А А | C | ••••• | C. | A | ••••• | T | TG. | •••• |
| SWRV3 | | AT | | | G | | | т. | .A.AT | |
| SWRV4 SWDV5 | ••••• | AT | •••••• | •••••• | ••••• | | •••••• | .CT | .A.AT | •••• |
| SWRV6 | c | .A | c | | c. | | | T | | |
| SWRV7 | c | .A | · · · · · · · · · · · | •••••• | ·····c·· | A | •••••• | · · · · T · · · · | T | •••• |
| | | | | | | | | | | |
| | 210 | 220 . | 230 • • • • • • • | 240 • • • • • • • • | 250 • • • • • • • • | 260 | 270 • • • • • • • • | 280 • • • • • • • • | 290 • • • • • • • • • | 300 I |
| Gottfried | GCCACCTCCACAAT | CAAGAAACGTT | ATAATACTA | ATGATAACTC | AAGAGGTATG | AACTTTGAAA | CATCTATGTT | TAATAAGGTG | GCTATTTTAAT | TTGT |
| SWRV1 SWRV2 | | .т | | T | | | | | | cc |
| SWRV 3 | GAG. | .TA | • • • • • • • • • • | ст | · · · · · · · · · · · · · | T.A. | .TC.A | •••••• | | •••• |
| SWRV4 SWRV5 | | . T A | | GCT | · · · · · · · · · · · · · · · · · · · | A | . TA.A | | | |
| SWRV6 | G. | .т | . c | T | · · · · · · · · · · · · · · · · · · · | · · · · · · · · · · · | c | cc | G | c |
| SWRV7 | G. | .т | | · · · · · · · T · · | •••••• | | c | cc | G | c |
| | 310 | 320 | 330 | 340 | 350 | 360 | 370 | 390 | 290 | 400 |
| 0-116-1-0 | | . | | | | | | | | |
| SWRV1 | | | ····· | | TG. | | ···· | | | |
| SWRV2 | | | ••••• | | T G. | ••••• | ••••• | A | | |
| SWRV3 SWRV4 | | | с | .CTC | TG. TAG. | | | c. | | |
| SWRV 5 | AC.T | .GA | c | .стс | <mark>TA</mark> G. | ••••• | ••••• | c. | .AGG | |
| SWRV6 SWRV7 | A | | | | T | | | ••••• | GCG. | |
| | | | | | | | | | | |
| | 410 | 420 | 430 | 440 | 450 | 460 | 470 l | 480 ll | 490 | 500 l |
| Gottfried | AGAATCATCAGGAT | GTACTTTTTCAT | T CAAAAGAA | стастсттаа | AAG <mark>CTGTTTT</mark> | AATAGCTATT | GG <mark>T CAAT CAA</mark> | AAGAAA <mark>TT</mark> GA | AACCACTGCCA | CTGC |
| SWRV1 SWRV2 | | | ••••• | | | | | · · · · · · · · · · · · · · · · · · · | T | |
| SWRV3 | | | G | T.A.GG. | T | | GA | ••••• | G | .A |
| SWRV4 SWRV5 | | | | AG. | G.T | ••••• | GAT. | A A | A A | .A |
| SWRV6 | | | | | | | | | | |
| SWRV7 | ••••• | ••••• | ••••• | ••••• | ••••• | ••••• | ••••• | ••••• | ••••• | •••• |
| | 510 | 520 | 530 | 540 | 550 | 560 | 570 | 580 | 590 | 600 |
| Cottfried | | . | | | | TATCTACATC | | GCCTA TTTTA | | TATT |
| SWRV1 | G. | | A | | | | A | CC | | C |
| SWRV2 | G. | | A | ••••• | C.A | | A | c | c | c |
| SWRV4 | T | | G. | | G | · · · T · · · · · · | | | | сс |
| SWRV 5 | TG. | GT | A. | | G | T | . C T . A | ••••• | G | cc |
| SWRV6 SWRV7 | G. | | A | | | G. | . C | G | | с с |
| | | | | | | | | | | |

Figura 2 – Alinhamento do fragmento parcial (926 nt) do gene codificador da proteína NSP2 de rotavírus suínos gerados no presente estudo - São Paulo - 2013

| | | | | | | | | | concl | usão |
|--------------------|--|-----------------------------|-----------------------|---------------------------|---------------------------------------|-------------------------------|---|---------------------------|----------------|-----------|
| | 610 | 620 | 630 | 640 | 650 | 660 | 670 | 680 | 690 | 700 |
| 0-116-4-4 | | | | | | | | | | |
| GULLITIEU SWDV1 | GAATACAAAATTAC | C C | ATAAACCAA | IIICAGAIGIA | | C | TURACIOAGO | C C | T | LA LAA |
| SMEWI | | с | | | 2 0 | | тг | с | т | сс. |
| SMDV3 | т с | G A | | | <u>са</u> с | с т | | G C | са т | CC |
| SWRVA | G T | с д | G | | | т | та 1 | с | САТ | с |
| SWRV 5 | G T | G A | G | | | т | тал | | са т | с |
| SWRV6 | | C | | | | | т | | т. | . GC |
| SWRV7 | | c | G | A.(| 3 | G | | G | т. | .GC |
| | | | | | | | | | | |
| | 710 | 720 | 730 | 740 | 750 | 760 | 770 | 780 | 790 | 800 |
| Gottfried | TAACACATGGTAAA | GG <mark>T CACTAC</mark> AG | AGTTGTAAA | ATATTCATCA | TTGCTAATC | ACGCAGATAG | AGTATTCGCTA | CATACAAAAA | TAATGCTAAA | AGCGG |
| SWRV1 | | . T | T | | A | | | | | |
| SWRV2 | | | т | | A | | | | | |
| SWRV 3 | | | т | | | T | | TT | G | T |
| SWRV4 | | T | . T | | | T | T | TT | | T |
| SWRV 5 | | T | T | | | T | T | TT | G | T |
| SWRV6 | | T | . T | | A | · · · · · · · · · · · · · · · | T | | <mark>.</mark> | T |
| SWRV7 | ••••• | T | T | | A | | . T | •••••G•• | <mark>.</mark> | T |
| | | | | | | | | | | |
| | 810 | 820 | 830 | 840 | 850 | 860 | 870 | 880 | 890 | 900 |
| Cottfried | | TTT A A TTTTA (TTA | | 8 T 8 8 T T T C C C 7 | | TCCD TTTD CD (| · · · · · · · · · · · · · · · · | | | TATCT |
| GULLITIEU GWDV1 | A T T | ITAATTIACIA | OACCAAAOA | AIAAIII00CA | A A A A A A A A A A A A A A A A A A A | C | C | T | ACICITOATO | IAIGI |
| SHEVI | ат т | | | | ā | c | c | т. | | |
| SWRV2 | A.II. | с тт | | | A | c | | I T | | |
| SWDVA | ат а | с тт | T | T | A | | A | т (| с | |
| SWRV4 | A.IA. | | | | | | A | | | |
| CANCE | A.IA. | | | | | | · · · · · A · · · · · | | | |
| SWRV0 | | | | | | | | | | |
| SHKV7 | | | | | | | | | | |
| | 910 | 920 | 930 | 940 | 950 | 960 | 970 | 980 | 990 | 1000 |
| | | | | | | | | | | |
| Gottfried | AAGAAACTACTCTT | CCAAAAGA TGA | AACAAGAGA | AAAATCCATTI | TAAAGGATTG | TCAACTGATA(| GAAAAA <mark>T</mark> GGA 1 | GAAGTTTCG | CACGTTGGAAT | TTAAT |
| SWRV1 | ••••• | • • • • • • • • • • • | · · · · · · · · · · | . G <mark>C</mark> | • • • • • • • • • • • | ••••• | •••••• | ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ | | ~ ~ ~ ~ ~ |
| SWRV2 | ••••• | • • • • • • • • • • • | · · · · · · · · · · | .G <mark>C</mark> | | ••••• | •••••• | | | ~ ~ ~ ~ ~ |
| SWRV3 | G | A | · · · · · · · · · · | | | ••••• | •••••• | ~~~~~~~ | ***** | ~ ~ ~ ~ ~ |
| SWRV4 | G | A | · · · · · · · · · · | | <mark>C.</mark> . | • • • • • • • • • • • | •••••••••••• | ~~~~~~~ | ******** | ~~~~~ |
| SWRV 5 | G | | | | <mark>C.</mark> . | • • • • • • • • • • • | ••••••••• | | | ~~~~~ |
| SWRV6 | | • • • • • • • • • • • | | | | • • • • • • • • • • • | ••••••••• | | | ~ ~ ~ ~ ~ |
| SWRV7 | ••••• | •••••• | •••••• | ••••• | ••••••• | ••••• | •••••• | | | ~ ~ ~ ~ ~ |
| | | | | | | | | | | |
| | 1010 | 1020 | 1030 | 1040 | 1050 | 1 | | | | |
| Gottfried | TCGCTTTCGATTCA | GAATGATGAT | GACGGAGCA | AGAATAGAAAI | COCTTATOT | GACC | | | | |
| SWRV1 | | | | | | ~~~~ | | | | |
| SWRW2 | | | | | | | | | | |
| CMDV3 | | | | | | | | | | |
| CMDUA | | | | | | | | | | |
| CMDU 5 | | | | | | | | | | |
| SHRV J | | | | | | | | | | |
| SHIKAD | no no ha | ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ | ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ | | | ~~~ | | | | |
| 24KV7 | ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ | ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ | ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ | ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ | | ~ ~ ~ ~ | | | | |

Figura 2 – Alinhamento do fragmento parcial (926 nt) do gene codificador da proteína NSP2 de rotavírus suínos gerados no presente estudo - São Paulo - 2013

Fonte: Barbosa (2013)

Na figura 3 está o alinhamento das sequências traduzidas para aminoácidos do gene codificador da NSP2 referente às amostras geradas no presente estudo, identificadas de SWRV1 a SWRV7, tomando-se como referência a amostra Gottfried (número de acesso GU199489).

Figura 3 – Alinhamento da sequência traduzida para aminoácidos do gene codificador da proteína NSP2 de rotavírus suínos gerados no presente estudo. A área em destaque refere-se ao domínio de ligação ao RNA (aa 205 a 241). As setas representam os resíduos de cisteína envolvidos nas pontes dissulfídicas (resíduos 6, 8, 85 e 285) e de histidina relacionada à atividade NTPase (resíduo 225) - São Paulo - 2013

| | | 20 • • • • • • • • | 30 | 40 • • • • • • • • • | 50 • • • • • • • • | 60 | 70 | 80 | 90 |
|--|--|--------------------------------|----------------------------------|---|--|--------------------------|--|--|--------------------------|
| Gottfried | MAELACF CYPHLENI | DSYKFIPFNS | LAIKCML TAI | KVDKKD () DKF YI | ISIVYGIAPPI | PQ FKKRY NT | NDNS <mark>RGMNFE</mark> T | SMFNKVAILIC | EALNS |
| SWRV1 | | N | | | | | | М | |
| SWRV2 | | N | | | | | | M | |
| SWRV3 | | | | | I | | ¥ | P | |
| SWRV4 | | | | | I | | s x. . | TA.V. | |
| SWRV 5 | | | | | I | | s x. . | TA.V. | |
| SWRV6 | | N | | | | | | M | |
| SWRV7 | | N | | | | | | M | |
| | | | | | | | | | |
| | 100 | 110 | 120 | 130 | 140 | 150 | 160 | 170 | 180 |
| Cottfried | TRUTOSTUANUT SD | WSVDHI FNI | | T FUSERIII K | WI TO TOOSKI | ETETTATAT | CCFTVFONDER | | TMDTI |
| SWDW1 | INVIQ3DVANVL3N | VV SVRILLIIL. | VERIENTQU | | VLINI 003N | STRIMING. | TAL OLD TAL OWNER | D | une IL |
| SHEAT | | | | | | | ····· | | |
| SWRV2 | тт | | | TAT (| · · · · · · · · · · · · · · · · · · · | | | | |
| SWRV J | WT I | | | | т | | | | |
| SWDV5 | WT I | | | D. | т | | | | |
| SWDW6 | v.1 | | | · · · · · · · · · · · · · · · · · · · | ····· | | тт | F | |
| SWDW7 | | | | | | | тт | F | |
| DILLY / | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | |
| | 190 | 200 | 210 | 220 | 230 | 240 | 250 | 260 | 270 |
| | 190 | 200 | 210 | 220 - | 230 | 240 | 250 • • • • • • • • | 260 | 270 • • • • • |
| Gottfried | 190 DQNF IEYKI TLNEDI | 200 KPISDVCVKE | 210 . VAELRWQYI | 220 | 230 YRVVKYSSV | 240 ANHADRVFA | 250 . TYKNNAKSGNV - | 260 T DFNLLDQRII | 270 WQNWY |
| Gottfried SWRV1 | 190 DQNFIEYKITLNEDI | 200 KP I SDV CVKE | 210 . . VAELRWQYI | 220 | 230 IYRVVKYSSVI | 240 ANHADRVFA | 250 . TYKNNAKSGNV | 260 T <mark>DFNLLDQRII</mark> | 270 WQNWY |
| Gottfried SWRV1 SWRV2 | 190 | 200 KPISDVCVKE M | 210 | 220 NRSAIITHGKGJ | 230 YRVVKYSSV/ | 240 ANHADRYFA | 250 . TYKNNAKSGNV I | 260 | 270 WQNWY |
| Gottfried SWRV1 SWRV2 SWRV3 | 190 DONFIEYKITLNEDI | 200 KPISDVCVKE | 210 | 220 NRSAIITHGKG .F.V .F.V .KF.V | 230 IYRVVKYSSV/ | 240 ANHADRVFA | 250 . TYKNNAKSGNV | 260 | 270 WQNWY |
| Gottfried SWRV1 SWRV2 SWRV3 SWRV4 | 190 DONFTEYKITLNEDI | 200 KPISDVCVKE | 210 | 220 NRSAIITHGKG .F.V .F.V .KF.V .KF.V | 230 IYRVVKYSSV/ | 240 | 250 | 260 TDFNLLDQRII .E | 270 WQNWY |
| Gottfried SWRV1 SWRV2 SWRV3 SWRV4 SWRV5 | 190 DONFIEYKITLNEDI V.V. V.V. | 200 KPISDVCVKE | 210 .VAELRWQYI SSSSSS | 220 NRSAIITHGKGI .F.V | 230 | 240 NHADRY FA | 250 | 260 TDFNLLD (RT I .E .E .E | 270 WQNWY |
| Gottfried SWRV1 SWRV2 SWRV3 SWRV4 SWRV5 SWRV5 SWRV6 | 190 DONFIEYKITLNEDI V.V. V.V. V. | 200 KPISDVCVKE | 210 | 220 NRSAIITHGKGI .F.V | 230 . YRVVKYSSV/ | 240 . ANHADRV FA | 250 TYKNNAKSCHV I I .FI .FI .FI | 260 TDFNLLDQRII .E | 270 WQNWY |
| Gottfried SWRV1 SWRV2 SWRV3 SWRV4 SWRV5 SWRV6 SWRV6 SWRV7 | 190 | 200 KPISDVCVKE | 210 | 220 NRSAIITHGKGJ .F.V. .KF.V. .KF.V. .KF.V. .F.A. .F.A. | 230 | 240 ANHADRA FA | 250 . TYKNNAKSCNV | 260 TDFNLLDQRII .E | 270 WQNWY |
| Gottfried SWRV1 SWRV2 SWRV3 SWRV4 SWRV5 SWRV6 SWRV7 | 190 | 200 KPISDVCVKE | 210 | 220 NRSAIITHGKG .F.V KF.V KF.V KF.A .F.A | 230 | 240 | 250 | 260 TDFNLLDQRII .E | 270 WQNWY |
| Gottfried SWRV1 SWRV2 SWRV3 SWRV4 SWRV5 SWRV6 SWRV7 | 190 | 200 KPISDVCVKE | 210 | 220 | 230 I I I I I I I I I I I I I I I I I I I | 240 | 250 . TYKNNAKSGNV .F .F | 260 TDFNLLDQRII .E | 270 1 WQIWY |
| Gottfried SWRV1 SWRV2 SWRV3 SWRV4 SWRV5 SWRV5 SWRV6 SWRV7 | 190 | 200 KPISDVCVKE | 210 | 220 | 230 | 240 | 250 . TYKNNAKSGNV | 260 TDFNLLDQRII .E | 270 1 WQNWY |
| Gottfried SWRV1 SWRV2 SWRV3 SWRV4 SWRV5 SWRV5 SWRV6 SWRV7 Gottfried SWRV1 | 190 | 200 KPISDVCVKE | 210 | 220 | 230 | 240 | 250 . TYKNNAKSGNV | 260 TDFNLLDQRII .E | 270 WQNWY |
| Gottfried SWRV1 SWRV2 SWRV3 SWRV4 SWRV5 SWRV5 SWRV6 SWRV7 Gottfried SWRV1 SWRV1 | 190 DONFIEYKITLNEDI V.V.V.V.V.V.V.V.V.V.V.V.V.V.V.V.V.V.V. | 200 KPISDVCVKE M | 210 | 220 NRSAIITHGKG .F.V KF.V KF.V KF.V .F.A .F.A STDRK | 230 | 240 | 250 . TYKNNAKSGNV .F .F | 260 TDFNLLDQRII .E E | 270 WQNWY |
| Gottfried SWRV1 SWRV2 SWRV3 SWRV4 SWRV5 SWRV6 SWRV6 SWRV7 Gottfried SWRV1 SWRV1 SWRV2 CMDV2 | 190 | 200 KPISDVCVKE | 210 | 220 .IINRSAIITHGKG .F.V | 230 | 240 ANHADRX FA | 250 I TYKNNAKSCHV I .FI .FI .FI | 260 TDFNLLDQRII .E .E | 270 ₩QN₩Y |
| Gottfried SWRV1 SWRV2 SWRV3 SWRV4 SWRV5 SWRV6 SWRV6 SWRV7 Gottfried SWRV1 SWRV2 SWRV3 SWRV3 | 190 | 200 KPISDVCVKE | 210 | 220 NRSAIITHGKG .F.V KF.V KF.V .KF.V .F.A .F.A STDRK | 230 | 24C | 250 . TYKNNAKS GNV | 260 TDFNLLDQRII E E | 270 ₩QN₩Y |
| Gottfried SWRV1 SWRV2 SWRV3 SWRV4 SWRV5 SWRV5 SWRV5 SWRV7 Gottfried SWRV1 SWRV2 SWRV3 SWRV3 SWRV4 SWRV4 | 190 | 200 KPISDVCVKE | 210 | 220 NRSAIITHGKG .F.V | 230 | 24C | 250 . TYKNNAKS GNV | 260 TDFNLLDQRII .E E | 270 ₩QN₩Y |
| Gottfried SWRV1 SWRV2 SWRV3 SWRV4 SWRV5 SWRV5 SWRV5 SWRV7 Gottfried SWRV1 SWRV2 SWRV3 SWRV4 SWRV4 SWRV5 SWRV5 SWRV6 | 190 | 200 KPISDVCVKE | 210 | 220 .II. NRSAIITHGKG .F.V. .F.V. .KF.V. .KF.V. .F.A. .F.A. .F.A. | 230 | 240 | 250 . TYKNNAKSGNV | 260 TDFNLLDQRII .E | 270 WQNWY |

Fonte: Barbosa (2013)

Na figura 4 encontra-se representado o alinhamento de nucleotídeos do gene codificador da NSP5 referente às amostras geradas no presente estudo, identificadas de SWRV1 a SWRV6, tomando-se como referência a amostra Gottfried (número de acesso GU199491).

| Gottfried | 10 . GGCTTTAAAAGCGCTA | 20 . CAGTGATGTC | 30 CTCAGCAT | 40 • • • • • • • • [GACGT AAC (| 50 GAGTCTTCCC | 60 <mark>FCAATTTCTT</mark> | 70 CTAGTATCTT | 80 TAAAAATGAAY | 90 • • • • CGTCT |
|--|---|----------------------------|-------------------------|---|---|---|---------------------------------|--|--|
| SWRV1 SWRV2 SWRV3 SWRV4 SWRV5 SWRV6 | T. | | | | | | | C C C C C | |
| Gottfried SWRV1 SWRV2 SWRV3 SWRV4 SWRV5 SWRV6 | 100 TCCACAACGTCAACTC .T | 110 TCTCTGGAAF .T | 120 AATCTATTGG | 130 | 140 . ACAGTACATT | 150 TCACCAGATG | 160 CAGAAGCATT | 170 CAATAAATAC | 180 ATGCTG T T T T T |
| Gottfried SWRV1 SWRV2 SWRV3 SWRV4 SWRV5 SWRV5 SWRV6 | 190 | 200 ATATTGGACC | 210 ATCTGATTC | 220 FGCTTCAAA | 230 CGACCCACTC T. T. T. | 240 ACCAGCTTTT | 250 . CGATTAGATC | 260 GAATGCAGTT | 270 •••• • \AGACA |
| Gottfried SWRV1 SWRV2 SWRV3 SWRV4 SWRV5 SWRV6 | 280 | 290 | 300 | 310 GCAATCACG A. A. | 320 | 330 AACGTTGGGT | 340 . GCGATCAAGT | 350 GGATTTCTCCT | 360 |
| Gottfried SWRV1 SWRV2 SWRV3 SWRV3 SWRV4 SWRV5 SWRV6 | 370 . AAAGGTATTAATGTTA GCA GCA GCA | 380 | 390 | 400 FATATCAAT T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T | 410 CTCGACTGAT AC AC AAC AAC | 420 DATABABAAGG G G G G G G | 430 AGAAATCCAA | 440 GAAAGATAAAA AC. A A A | 450 AGT AGG |
| Gottfried SWRV1 SWRV2 SWRV3 SWRV4 SWRV5 SWRV5 SWRV6 | 460 . AAACACT ACCCGAGAP A. A. A. T. T. T. | 470 TTGAAGCAGA | 480 | 490 TGAAGATTAT | 500 FGTTTAGAT C | 510 . GATTCAGATA | 520 GTGATGACGG C.T C.T | 530 . TAAATGTAAG | 540 AATTGT |
| Gottfried SWRV1 SWRV2 SWRV3 SWRV4 SWRV5 SWRV5 SWRV6 | 550 . AAAT AT AAGAAAAAGT C. A. G. A. C. A. G. A. C. A. G. A. C. A. G. A. C. A. G. A. | 560 | 570 PAGAATGAG | 580 GATGAAGCA | 590 . AGTCGCAATG | 600 . CAATTGATCG | 610 AAGATTTGTA | 620 . ATGTCAACCT .GG .GG .GG | 630 |
| Gottfried | 640 . | 650 • • • • • • • • | 660 • • • • • • • | | | | | | |

Figura 4 – Alinhamento do fragmento completo (619 nt) do gene codificador da proteína NSP5 de rotavírus suínos gerados no presente estudo - São Paulo - 2013

Fonte: Barbosa (2013)

Na figura 5 está o alinhamento das sequências traduzidas para aminoácidos do gene codificador da NSP5 referente às amostras geradas no presente estudo, identificadas de SWRV1 a SWRV6, tomando-se como referência a amostra Gottfried (número de acesso GU199491).

Figura 5 – Alinhamento da sequência traduzida para aminoácidos do gene codificador da proteína NSP5 de rotavírus suínos gerados no presente estudo. As setas representam os locais de fosforilação (resíduos 2, 4, 30, 37, 42, 56, 67, 101, 127, 163), com destaque para o resíduo 37 (seta vermelha) onde houve mudança do aminoácido serina - São Paulo - 2013

| Gottfried SWRV1 SWRV2 SWRV3 SWRV4 SWRV4 SWRV5 SWRV5 | .↓.↓ MSLSIDV | 10 | 20 . SIFKNESSS | | den de la construction de la co | 50 EAFNKYML: | E | ↓ 70 ↓ . DSASNDP |
|--|-----------------|-----------------------|--------------------------------|-------------------------|---|----------------------|-------------|----------------------------|
| Gottfried SWRV1 SWRV2 SWRV3 SWRV4 SWRV5 SWRV5 SWRV6 | | 80 SNAVKTNAI | 90 DAG V SMD S S | | | 120 | L L V | 140 |
| Gottfried SWRV1 SWRV2 SWRV3 SWRV4 SWRV5 SWRV5 SWRV6 | KSRKHYP) | 150 | | 170 DDGKCKNCKY | 180 | 190 | LL | |

Fonte: Barbosa (2013)

Na figura 6 encontra-se representado o alinhamento de nucleotídeos do gene codificador da NSP6 referente às amostras geradas no presente estudo, identificadas como SWRV1 a SWRV6, tomando-se como referência a amostra CMP034 (número de acesso DQ916134).

| | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 | 80 |
|--|-------------------------------|--------------------------|--|---|---------------------------------|---|--|-------------------------------|
| CMD034 | | | | | | | | CACAA |
| SWRV1 | AIGAAICGICIICIA | CAACGICAAC | ICT I I CI GGZ | MAATCIAIIG | AC | ACAGI ACAI . | ICACCAGAIG | CAGAA |
| SWRV2 | | | | | | | | |
| SWRV3 | | | | | | | | |
| SWRV4 | | | | | | | | |
| SWRV5 | | | | | · · · · · · · · · · · · | | | |
| SWRV6 | •••••• | ••••• | • • • • • • • • • • | • • • • • • • • • • | ••••• | ••••• | •••••• | • • • • • |
| | | | | | | | | |
| | 90 | 100 | 110 | 120 | 130 | 140 | 150 | 160 |
| CMP034 | GCATTCAATAAATAC | ATGTTGTCGA | AGTCTCCAG | GGATATTGGA | CATCTGATT | CTGCTTCAA | ACGATCCACTC | ACCAG |
| SWRV1 | | | | | | | | |
| SWRV2 | | · · · · · · · · · · · · | | | • • • • • • • • • • • | • • • • • • • • • • | | |
| SWRV3 | ••••• | ••••• | | • • • • • • • • • • | • • • • • • • • • • | • • • • • • • • • • | • • • • • • • • • • • | |
| SWRV4 | ••••• | • • • • • • • • • • • | •••••• | A. | ••••• | • • • • • • • • • • | c | • • • • • |
| SWRV5 | ••••• | ••••• | ••••• | A. | • • • • • • • • • • • | ••••• | · · · · C. · · · · · | •••• |
| SWKVO | | | | | | | | |
| | | | | | | | | |
| | 170 | 180 | 190 | 200 | 210 | 220 | 230 | 240 |
| | 170 • • • • • • • • • | 180 • • • • • • • • | 190 • • • • • • • • | 200 • • • • • • • • | 210 • • • • • • • • | 220 • • • • • • • • | 230 • • • • • • • • | 240 • • • • |
| CMP034 | 170 CTTTTCGATTAGATC | 180 CGAATGCAGTT | 190 AAGACAAAT | 200 CAGACGCTGG | 210 CGTGTCTATG | 220 GATTCATCG | 230 | 240 ACCTT |
| CMP034 SWRV1 | 170 CTTTTCGATTAGATC | 180 CGAATGCAGTT | 190 AAGACAAATO | 200 GCAGACGCTGG T | 210 CGTGTCTATG | 220 GATTCATCG | 230 | 240 ACCTT |
| CMP034 SWRV1 SWRV2 SWRV3 | 170 CTTTTCGATTAGATC | 180 GAATGCAGTT | 190 AAGACAAATO | 200 GCAGACGCTGG T T | 210 C GTGTCTATG | 220 GATTCATCGJ | 230 ACGCAATCACG A | 240 ACCTT |
| CMP034 SWRV1 SWRV2 SWRV3 SWRV4 | 170 CTTTTCGATTAGATC | 180 CGAATGCAGTT | 190 | 200 CAGACGCTGG T. T. T. | 210 CGTGTCTATG | 220 GATTCATCGJ | 230 | 240 ACCTT |
| CMP 034 SWRV1 SWRV2 SWRV3 SWRV3 SWRV4 SWRV5 | 170 CTTTTCGATTAGATC | 180 CGAATGCAGTT | 190 RAGACAAATC | 200 CAGACGCTGG T T | 210 | 220 GATTCATCGJ | 230 | 240 ACCTT |
| CMP 034 SWRV1 SWRV2 SWRV3 SWRV4 SWRV5 SWRV5 | | 180 GAATGCAGTT | 190 AAGACAAATO | 200 CAGACGCTGGG T T T | 210 | 220 GATTCATCGJ | 230 ACGCAATCACG . A . A . A . A | 240 ACCTT |
| CMP034 SWRV1 SWRV2 SWRV3 SWRV4 SWRV5 SWRV6 | | 180 | 190 AAGACAAATO | 200 CCAGACGCTGG | 210 | 220 GATTCATCG AA AA | 230 | 240 ACCTT |
| CMP 034 SWRV1 SWRV2 SWRV3 SWRV4 SWRV4 SWRV5 SWRV6 | 170 | 180 | 190 AAGACAAAT 270 | 200 CAGACGCTGG T T | 210 CGTGTCTATG | 220 | 230 | 240 ACCTT |
| CMP 034 SWRV1 SWRV2 SWRV3 SWRV4 SWRV5 SWRV6 | 170 CTTTTCGATTAGATC | 180 | 190 AAGACAAATC | 200 | 210 GTGTCTATG | 220 GATTCATCGJ A A A A A | 230 | 240 EACCTT |
| CMP034 SWRV1 SWRV2 SWRV3 SWRV4 SWRV5 SWRV6 CMP034 | 170 CTTTTCGATTAGATC | 180 | 190 AAGACAAATO 270 GGATTTCCC | 200 | 210 CGTGTCTATG | 220 GATTCATCGJ A A A A A | 230 | 240 FACCTT |
| CMP034 SWRV1 SWRV2 SWRV3 SWRV4 SWRV5 SWRV6 CMP034 SWRV1 SWRV1 SWRV2 | 170 CTTTTCGATTAGATC | 180 | 190 AAGACAAATO 270 GGATTTCTCC | 200 | 210 CGTGTCTATG | 220 GATTCATCGI A A A A A A | 230 | 240 ACCTT |
| CMP034 SWRV1 SWRV2 SWRV3 SWRV4 SWRV5 SWRV6 CMP034 SWRV1 SWRV2 SWRV3 | 170 CTTTTCGATTAGATC | 180 | 190 AAGACAAATC 270 | 200 | 210 CGTGTCTATG | 220 GATTCATCGI A A A A A | 230 ACGCAATCACG . A | 240 ACCTT |
| CMP034 SWRV1 SWRV2 SWRV3 SWRV4 SWRV5 SWRV5 SWRV6 CMP034 SWRV1 SWRV2 SWRV3 SWRV3 | 170 | 180 | 190 AAGACAAATC 270 GGATTTCTCC | 200 CAGACGCTGG T T | 210 | 220 GATTCATCGJ A A A A A | 230 | 240 ;ACCTT |
| CMP 034 SWR V1 SWR V2 SWR V3 SWR V4 SWR V5 CMP 034 SWR V1 SWR V2 SWR V3 SWR V4 SWR V5 | 170 | 180 | 190 AAGACAAATC 270 GGATTTCTCC | 200 | 210 | 220 GATTCATCGI A A A A A | 230 | 240 ACCTT |
| CMP 034 SWR V1 SWR V2 SWR V3 SWR V4 SWR V5 SWR V6 CMP 034 SWR V1 SWR V2 SWR V3 SWR V4 SWR V5 SWR V6 | 170 | 180 | 190 AAGACAAATC 270 | 200 | 210 CGTGTCTATG | 220 GATTCATCGI A A A A A A | 230 | 240 |

Figura 6 – Alinhamento do fragmento completo (276 nt) do gene codificador da proteína NSP6 de rotavírus suínos gerados no presente estudo - São Paulo - 2013

Fonte: Barbosa (2013)

Na figura 7 está o alinhamento das sequências traduzidas para aminoácidos do gene da NSP6 referente às amostras geradas neste estudo, identificadas de SWRV1 a SWRV6, tomando-se como referência a amostra CMP034 (número de acesso DQ916134).

Figura 7 – Alinhamento da sequência traduzida para aminoácidos do gene codificador da proteína NSP6 de rotavírus suínos gerados no presente estudo - São Paulo - 2013

| | 10 20 30 40 50 |
|--------|--|
| CMP034 | MNRLLQRQLFLENLLQGANSTFHQMQKHSINTCCRSLQRILDHLILLQTI |
| SWRV1 | |
| SWRV2 | |
| SWRVJ | |
| SWRV5 | |
| SWRV6 | T |
| | |
| | 60 70 80 90 |
| CMP034 | HSPAFRLDRMQLRQMQTLACLWIHRRNHDLQVTLGAIKWISP |
| SWRV1 | QHA |
| SWRV2 | QHA |
| SWRV3 | QHA |
| SWRV4 | л |
| SWRV6 | |

Fonte: Barbosa (2013)

5.4 Matrizes de identidade

A matriz de identidade para a NSP2 foi definida com base em uma área consensual de 926 nt de comprimento (Apêndice B). A região corresponde aos resíduos de nucleotídeos 47 a 972 da região codificadora da NSP2, tomando-se como referência a amostra Gottfried (número de acesso GU199489). Os valores de similaridade da região consensual das sequências de rotavírus geradas neste estudo (SWRV1 a SWRV7), bem como frente às demais representativas do genotipo N1 de NSP2 depositadas no Genbank, estão apresentadas no quadro 4, apêndice E.

Com relação à NSP5, a matriz de identidade foi definida com base em uma área consensual de 594 nt de comprimento (Apêndice C), a qual corresponde aos resíduos de nucleotídeos 22 a 615 do gene codificador da NSP5, tomando-se como referência a amostra Gottfried (número de acesso GU199491). Os valores de similaridade da região consensual das sequências de rotavírus geradas neste estudo (SWRV1 a SWRV6), e também frente às demais representativas do genotipo H1 de NSP5 depositadas no Genbank, estão apresentadas no quadro 5, apêndice F.

No caso da NSP6, foi definida uma área consensual de 279 nt de comprimento entre as amostras aqui geradas e outras previamente depositadas no Genbank, correspondendo aos resíduos de nucleotídeos 80 a 358 do gene codificador da NSP6, tomando-se como referência a amostra CMP034 (número de acesso DQ916134) (Apêndice D). Os valores de similaridade da região consensual das sequências de rotavírus geradas neste estudo (SWRV1 a SWRV6), e também frente às demais depositadas no Genbank para NSP6, encontram-se no quadro 6, apêndice G.

Quadro 4 – Valores de similaridade nucleotídica e de aminoácidos da região consensual das sequências de rotavírus geradas neste estudo (SWRV1 a SWRV7), bem como frente às demais representativas do genotipo N1 de NSP2 depositadas no Genbank - São Paulo - 2013

| Similaridade | Nucleotídeos (max/min) | Aminoácidos (max/min) |
|--|--|--|
| Entre as sequências geradas neste estudo | 100%: SWRV4 = SWRV5 86,4%: SWRV1XSWRV4;SWRV5 | 100%: SWRV4 = SWRV5; SWRV6 = SWRV7 91,5%: SWRV4;SWRV5XSWRV6 SWRV4;SWRV5XSWRV7 |
| Entre as sequências geradas neste estudo frente às demais N1 selecionadas do GenBank | 95,4%: SWRV2XGU199517 81,7%: SWRV4;SWRV5XEF990688 | 98,3%: SWRV2XDQ494401;DQ494402 87%: SWRV5XEF990688 |

Fonte: Barbosa (2013)

Quadro 5 – Valores de similaridade nucleotídica e de aminoácidos da região consensual das sequências de rotavírus geradas neste estudo (SWRV1 a SWRV6), bem como frente às demais representativas do genotipo H1 de NSP5 depositadas no Genbank - São Paulo - 2013

| Similaridade | Nucleotídeos (max/min) | Aminoácidos (max/min) | |
|--|---|---|--|
| Entre as sequências geradas neste estudo | 100%: SWRV1 = SWRV2; SWRV4 = SWRV5 95,1%: SWRV1;SWRV2XSWRV6 | 100%: SWRV1 = SWRV2 = SWRV3; SWRV4 = SWRV5 97,4%: SWRV1;SWRV2;SWRV3XSWRV4; SWRV5 | |
| Entre as sequências geradas neste estudo frente às demais H1 selecionadas do GenBank | 97,1%: SWRV4;SWRV5;SWRV6X GU199491 88,2%: | 99,4%: SWRV4;SWRV5;SWRV6XGU199491; DQ916134 90,7%: | |
| | SWRV1;SWRV2XEF990690 | 5 WK V 1,5 WK V 2,5 WK V 5AEF990090 | |

Fonte: Barbosa (2013)

Quadro 6 – Valores de similaridade nucleotídica e de aminoácidos da região consensual das sequências de rotavírus geradas neste estudo (SWRV1 a SWRV6), bem como frente às demais sequências do gene NSP6 depositadas no Genbank - São Paulo - 2013

| Similaridade | Nucleotídeos (max/min) | Aminoácidos (max/min) | |
|---|---|---|--|
| Entre as sequências geradas neste estudo | 100%: SWRV1 = SWRV2 = SWRV3; SWRV4 = SWRV5 97,4%: SWRV1;SWRV2;SWRV3XSWRV4;S WRV5;SWRV6 | 100%: SWRV1 = SWRV2 = SWRV3; SWRV4 = SWRV5 93,4%: SWRV1;SWRV2;SWRV3XSW RV4;SWRV5 | |
| Entre as sequências geradas neste estudo frente às demais selecionadas do GenBank | 98,9%: SWRV6XJF796722;JF796700 91,3%: SWRV4;SWRV5;SWRV6X AY769694;EF185863 | 100%: SWRV6 = JF796722 79,3%: SWRV4;SWRV5X AY769694;EF185863 | |

As sequências obtidas no item 5.3 foram traduzidas putativamente para aminoácidos, sendo definida uma área consensual de 309 aminoácidos de comprimento entre as amostras aqui geradas com outras previamente depositadas junto ao Genbank (Apêndice B). A região corresponde aos resíduos de aminoácidos 16 a 324 do gene codificador da NSP2, tomando-se como referência a amostra Gottfried (número de acesso GU199489). Portanto, foi definida neste estudo uma área que corresponde a 97,5% da porção codificadora da proteína NSP2 (309/317 aa) presente no segmento genômico 8 dos rotavírus.

No caso da NSP5, foi determinada uma área consensual de 197 aminoácidos de comprimento entre as amostras aqui geradas e outras previamente depositadas no Genbank, sendo esta área correspondente aos resíduos de aminoácidos 8 a 204 do gene codificador da NSP5, tomando-se como referência a amostra Gottfried (número de acesso GU199491) (Apêndice C). Sendo assim, definiu-se neste estudo a área total correspondente à porção codificadora da proteína NSP5 (204/204 aa) presente no segmento 11 do genoma dos rotavírus.

Já para NSP6, a área consensual determinada foi correspondente a 92 aminoácidos de comprimento entre as amostras do presente estudo e outras previamente depositadas no Genbank. A região corresponde aos resíduos de aminoácidos 1 a 92 do gene codificador da NSP6, tomando-se como referência a amostra CMP04 (número de acesso DQ916134) (Apêndice D). Assim sendo, definiu-se também completamente a área correspondente à porção codificadora da proteína NSP6 (92/92 aa) presente no segmento 11 do genoma dos rotavírus.

5.6 Inferências filogenéticas a partir das sequências nucleotídicas

A árvore genealógica referente ao fragmento parcial (926 nt) dos nucleotídeos codificadores da proteína NSP2 dos rotavírus detectados no presente estudo juntamente com sequências representativas dos demais genotipos N recuperadas do Genbank estão

apresentadas na figura 8. Portanto, foi contemplada na inferência filogenética uma área equivalente a 97% da porção codificadora da NSP2 (926/954 nt), haja vista que a região completa corresponde aos resíduos de nucleotídeos 47 ao 1000 (954).

Da mesma forma, a árvore genealógica referente ao fragmento completo (594 nt) dos nucleotídeos codificadores da proteína NSP5 dos rotavírus detectados no presente estudo juntamente com as sequências representativas dos demais genotipos H (exceto H9 e H11) recuperadas do Genbank estão apresentadas na figura 9. Assim sendo, foi contemplada na inferência filogenética toda a porção codificadora da proteína NSP5 (594/594 nt).

Figura 8 – Árvore filogenética construída com o método de *neighbor-joining* usando *maximum composite likelihood* como modelo de substituição nucleotídica (Software Mega v. 5) para o fragmento parcial (926 nt) do gene codificador da proteína NSP2 dos rotavírus. As amostras apresentam a identificação *accession number* / hospedeiro / amostra / genotipo NSP2. Os números próximos a cada nó representam os valores de 1000 repetições de *bootstrap*, tendo sido demonstrados apenas aqueles superiores a 70%. As amostras de suínos definidas neste estudo estão marcadas com triângulos pretos. A escala representa o número de substituições por sítio - São Paulo - 2013



Fonte: Barbosa (2013)

Figura 9 – Árvore filogenética construída com o método de neighbor-joining usando maximum composite likelihood como modelo de substituição nucleotídica (Software Mega v. 5) para o fragmento completo (594 nt) do gene codificador da proteína NSP5 dos rotavírus. As amostras apresentam a identificação accession number/ hospedeiro / amostra / genotipo NSP5. Os números próximos a cada nó representam os valores de 1000 repetições de bootstrap, tendo sido demonstrados apenas aqueles superiores a 70%. As amostras de suínos definidas neste estudo estão marcadas com triângulos pretos. A escala representa o número de substituições por sítio - São Paulo - 2013



Fonte: Barbosa (2013)

6 DISCUSSÃO

Estudos realizados sobre a ocorrência de RVA em suínos em diversas regiões do Brasil revelam uma distribuição relativamente ampla deste agente nas criações em todo o país (GREGORI et al., 2009; LINARES et al., 2009; MEDICI et al., 2011). Os resultados demonstrados no presente estudo corroboram o exposto, considerando que cinco dos seis municípios avaliados apresentaram amostras positivas para rotavírus, com uma frequência total de 27% (17/63), muito similar à encontrada por Gregori et al. (2009) de 29,9%, em trabalho realizado também com suínos no estado de São Paulo.

É interessante notar que no momento da colheita das amostras a granja proveniente do município de Bragança Paulista, da qual todas as amostras foram negativas ao teste de triagem por *Nested*-PCR, foi a única em que nenhum dos animais apresentou quadro de diarreia e a única também a realizar a vacinação contra o rotavírus do grupo A, sistematicamente, o que sugere a eficácia desta prática para o controle das rotaviroses. No entanto, ainda são escassos os trabalhos na literatura que correlacionem a vacinação de porcos com a ausência da doença. Desta forma, estudos de coorte ou mesmo caso-controle poderiam trazer maior consistência a esta suposição.

Atualmente, a técnica de RT-PCR tem sido amplamente utilizada para o diagnostico de rotavírus. A elevada sensibilidade e especificidade da mesma permite detectar a presença do agente mesmo quando em baixas concentrações na amostra e, desta forma, contribui para uma estimativa mais precisa quanto à prevalência da doença nas criações de animais, bem como a distribuição geográfica e sazonal do agente, e ainda a definição dos genotipos circulantes (DESSELBERGER et al., 2001).

Entretanto, no presente estudo, das 17 amostras fecais previamente triadas como positivas para rotavírus, apenas nove apresentaram-se positivas à RT-PCR direcionada aos segmentos genômicos codificadores das proteínas NSP2 e NSP5/6 (item 5.1). Alguns fatores podem ter colaborado para essa perda, tais como as condições de armazenamento das amostras e/ou congelamentos e descongelamentos sucessivos das mesmas, que levariam à degradação do material genético, resultando em "falsos negativos", ou ainda, erros durante o processamento da técnica de RT-PCR. Porém, todas as amostras foram armazenadas e

processadas de maneira idêntica, e o controle positivo comportou-se dentro do esperado em todos os ensaios, o que contesta as hipóteses acima. Uma alternativa seria o uso de controles internos exógenos na reação da PCR, tal qual proposto por Asano et al. (2009).

Outra suposição seria uma baixa concentração viral nas amostras negativas, visto se tratar de material clínico, e neste caso o isolamento do vírus em células de cultivo poderia alterar tais resultados.

Como último argumento, tendo em vista os mecanismos de variabilidade genética dos rotavírus (*shifts, drifts, rearranjos* e recombinações), é possível que tenham ocorrido falhas na hibridização dos primers desenvolvidos por Matthijnssens et al. (2006) e os desenhados por nós para este estudo (item 4.2). Provavelmente, o desenho de outros primers que contemplassem a diversidade genética dos rotavírus de acordo com as espécies hospedeiras contornaria este inconveniente. Com efeito, observa-se dentro dos genotipos a coexistência de diferentes clados (Figuras 8 e 9), denotando essa característica de variabilidade, ainda que as áreas de hibridização dos primers sejam mais conservadas.

Cabe ressaltar que a utilização de primers randômicos neste estudo proporcionou uma economia de reagentes e tempo, possibilitando o estudo de diferentes genes (e outros agentes virais, se fosse o caso) a partir de uma única reação de transcrição reversa.

Com relação ao sequenciamento das amostras, das nove positivas, sete tiveram o gene codificador da NSP2 sequenciado, e seis da NSP5/6 (item 5.2). Supõe-se que esta perda esteja relacionada principalmente à quantidade de DNA presente na amostra e/ou à purificação insatisfatória dos produtos submetidos à reação de sequenciamento.

Ao que refere à filogenia, as árvores propostas (Figuras 8 e 9) guardaram correspondência com as respectivas matrizes de identidade e também na segregação dos genotipos anteriormente descritos na literatura para cada proteína (MATTHIJNSSENS et al., 2008b; MATTHIJNSSENS et al., 2011), inclusive amparadas por alto valor de bootstrap.

No que diz respeito à NSP2, as amostras deste estudo foram sequenciadas parcialmente, num equivalente a 97% da porção codificadora deste gene, ficando ausente apenas a porção final do segmento, que corresponde a 9 aminoácidos ou 27 nucleotídeos. A

saber, a região completa do segmento 8 que codifica a NSP2 é composta por 317 aminoácidos (954 nucleotídeos) (SCHUCK et al., 2001). Sendo assim, a análise filogenética destas amostras revelou a circulação do genotipo N1 nos municípios amostrados, sustentado por alto valor de bootstrap (Figura 8), o qual para a espécie suína é o único relatado até o momento, mas que também já foi descrito em humanos, bovinos e felinos (MARTELLA et al., 2010; MATTHIJNSSENS et al., 2008, 2011).

Observamos ainda que as amostras SWRV3, SWRV4 e SWRV5 segregaram-se em um cluster isolado, cujo nó contempla amostras predominantemente animais, pertencentes ao genotipo N1, e mais proximamente relacionadas à amostra IAL28 (Figura 8), a qual foi isolada no Brasil em 1992 a partir de uma criança com diarreia, e que foi classificada como G5, outro genotipo comumente descrito em suínos (HEIMAN et al., 2008). As demais SWRV1, SWRV2, SWRV6 e SWRV7, por outro lado, agruparam-se em um cluster que contempla amostras de animais e de humanos.

Tais achados sugerem uma proximidade filogenética entre amostras humanas e animais, levantando a hipótese de transmissão interespécies, na qual os suínos podem atuar como fonte de infecção para humanos (PAHO, 2001; COOK et al., 2004). Inclusive as amostras SWRV3, SWRV4 e SWRV5 apresentaram um alto valor de similaridade com a IAL28, como pode ser observado no apêndice E, com 94 a 95,1% de similaridade para nucleotídeos e 96,1% para aminoácidos, o que corrobora essa hipótese.

A identidade nucleotídica variou de 86,4% (SWRV1 com ambas SWRV4 e SWRV5) a 100% (SWRV4 = SWRV5). Quanto à identidade em termos de aminoácidos, ela variou de 91,5% (SWRV4 e SWRV5 com ambas SWRV6 e SWRV7) a 100% (SWRV4 = SWRV5, SWRV6 = SWRV7) (Quadro 4). Com relação às maiores identidades, cabe notar que as amostras idênticas SWRV4 e SWRV5 são provenientes de uma mesma propriedade localizada no município de Cunha, e colhidas num mesmo momento, assim como SWRV6 e SWRV7, por sua vez provenientes do município de Fartura (Quadro 3). Assim sendo, podemos inferir que não houve infecções mistas nas granjas dos municípios citados, ou seja, em cada um deles as infecções foram ocasionadas pela mesma fonte viral. No entanto, casos de infecções mistas para esse vírus já foram relatados previamente, por exemplo, por Gregori et al. (2009) em amostras de suínos, e recentemente por Silva et al. (2012), em bovinos, porém ambos os estudos relacionados aos genes da VP4 e VP7. Em contrapartida, as amostras com menor identidade nucleotídica e de aminoácidos provêm dos municípios de Pereiras (SWRV1), Cunha (SWRV4 e SWRV5) e Fartura (SWRV6 e SWRV7), o que apesar de ratificar a circulação do genotipo N1 nas criações de suínos no estado de São Paulo, como exposto anteriormente, também sugere que estes vírus tenham sofrido uma variação intragenotípica que resultou nesta distância filogenética demonstrada pela diferença de 13,6%, em termos de nucleotídeos, e 8,5% em termos de aminoácidos (Figura 8, Quadro 4 e Apêndice E).

Já os valores de identidade entre as sequências geradas neste estudo e as de genotipo N1 que já foram depositadas no GenBank, com base no alinhamento nucleotídico e na matriz de identidade (Apêndices B e E, Quadro 4), demonstraram uma similaridade de 95,4% entre as amostras SWRV2 e YM, esta de origem suína (número de acesso GU199517), enquanto que a maior diferença observada (18,3%) foi entre as amostras SWRV4 e SWRV5 e a A131 (número de acesso EF990688), também suína.

Em termos de aminoácidos, a maior identidade foi entre a amostra SWRV2 com as amostras KJ44 e KJ75 (números de acesso DQ494401 e DQ494402, respectivamente), ambas de origem bovina, isoladas na Coreia do Sul. Já a menor similaridade continuou sendo entre SWRV4 e SWRV5 e a EF990688 (Quadro 4 e Apêndice E).

Patton et al. (1993) identificaram uma região na NSP2, correspondente aos resíduos de aminoácidos 205 a 241, como sendo o domínio de ligação desta proteína com o RNA, e verificaram se tratar de uma região altamente conservada entre os rotavírus do grupo A. As amostras do presente estudo apresentaram variabilidade nas posições R215K, S216F e I218V (Figura 3). Entretanto, tais mutações também são observadas nas amostras-padrão OSU, UK, NCDV, Wa e SA11 (DYALL-SMITH et al., 1983; RUSHLOW et al., 1988; PATTON et al., 1993). Observou-se variabilidade também nas posições A207S e I218A (Figura 3), sendo que para estas não há relatos em literatura. No entanto, em nenhum dos casos podemos afirmar que tais mutações interferiram na função da proteína em termos quantitativos, uma vez que não foi realizada quantificação proteica. Por outro lado, porém, os resultados sugerem que não houve prejuízo em termos qualitativos, já que o vírus estava viável e a proteína foi expressa normalmente. Assim sendo, um estudo de quantificação proteica seria interessante de modo a elucidar se, e o quanto, as mutações citadas interferem na virulência do rotavírus.

No mesmo estudo conduzido por Patton et al. (1993), foi também definido o domínio relacionado à função de "motor molecular" da NSP2, o qual se refere aos resíduos 6, 8, 85 e 285 de cisteína e a uma extensa região conservada de 75 bases (b) que incluem 35b na 5'-região não codificante-3' e as primeiros 30b da ORF. Os resíduos de cisteína estão envolvidos com as pontes dissulfídicas que unem a proteína em pontos específicos ao longo de seu comprimento, conferindo a ela uma estrutura octamérica. Com base nisso, para que a NSP2 "carregue" o RNA até o local de "empacotamento", ela precisa sofrer uma mudança conformacional em sua estrutura, mediante a quebra dessas pontes (PATTON et al., 1993; SHUCK et al., 2001). Dado o exposto, não houve quaisquer alterações relacionadas a tais domínios nas amostras do presente estudo (Figuras 2 e 3).

Ainda, Kumar et al. (2007) demonstraram que a atividade enzimática da NSP2 como trifosfatase está relacionada ao aminoácido histidina na posição 225, altamente conservado, que funciona como um resíduo catalítico para esta função, e que a mutação neste resíduo impede a síntese de dsRNA. Em nosso trabalho, todas as amostras apresentaram histidina na posição 225 (Figuras 2 e 3).

Ao que se refere à NSP5, a porção do segmento 11 que a codifica é composta por 198 aminoácidos (594 nucleotídeos), ao passo que a porção codificadora da NSP6 neste mesmo gene possui 92 aminoácidos (279 nucleotídeos) (ESTES; KAPIKIAN, 2007). No presente trabalho, todas as sequências geradas abrangeram completamente a porção codificadora destas proteínas, exceto a amostra SWRV7, que apresentou um reduzido comprimento após o sequenciamento (157 pb) e, portanto, não participou das análises subsequentes para NSP5/6 (Anexo A).

Wen et al. (2009) caracterizaram uma amostra de rotavírus do grupo A isolada na China a partir de uma criança apresentando gastroenterite e através de inferências filogenéticas observaram que os rotavírus poderiam ser classificados em 7 genotipos (denominados H1 a H7) ao se considerar a diversidade genética apresentada pelo gene codificador da NSP5. No entanto, a nova classificação proposta por Matthijnssens et al. (2011) descreve mais quatro, totalizando 11 genotipos.

Com base na análise filogenética para este gene e na topologia da árvore gerada no presente estudo, observou-se que as amostras suínas aqui avaliadas pertencem ao genotipo H1

da NSP5, sustentado por alto valor de bootstrap (Figura 9). Sabe-se, até o momento, que apenas este genotipo de NSP5 foi relatado nesta espécie animal, porém já foi descrito também em humanos e bovinos (MARTELLA et al., 2010; MATTHIJNSSENS et al., 2011).

Ademais, as amostras SWRV1, SWRV2 e SWRV3 segregaram-se em um cluster isolado, cujo nó contemplou também a amostra humana IAL28, com a qual aquelas amostras apresentaram elevadas identidades nucleotidica e de aminoácido variando de 94,1 a 94,6% e 94,3%, respectivamente (Figura 9 e Anexo F).

Convém notar que a literatura não definiu até o momento nenhuma classificação genotípica para NSP6, uma vez que a porção codificadora deste gene está contida dentro da NSP5. Desta forma, como sugerido por Matthijnssens et al. (2008), a análise filogenética em termos de nucleotídeos para a NSP6 seria quase idêntica à da NSP5.

Para NSP5, a identidade nucleotídica entre as amostras do presente estudo variou de 100% (SWRV1 = SWRV2; SWRV4 = SWRV5) a 95,1% (SWRV6 com SWRV1 e SWRV2) (Quadro 5). As amostras SWRV1 e SWRV2 são provenientes de uma mesma propriedade, localizada no município de Pereiras, e colhidas no mesmo momento, assim como as amostras SWRV4 e SWRV5, que são provenientes do município de Cunha. Fato semelhante foi observado para NSP2 neste estudo, e tal como proposto para esta, deduzimos a possibilidade de surto decorrente de uma fonte viral comum, nos respectivos municípios.

Entre as sequências geradas neste estudo e as de genotipo H1 já depositadas no GenBank, com base no alinhamento nucleotídico e na matriz de identidade (Apêndices C e F, Quadro 5), verificou-se que as amostras SWRV4, SWRV5 e SWRV6 tiveram 97,1% de semelhança com a amostra suína Gottfried (GU199491), enquanto que a maior diferença observada (11,8%) foi das amostras SWRV1 e SWRV2 com a também suína, A131 (EF990690).

Já em termos de aminoácidos, a identidade entre as amostras deste estudo variou de 100% (SWRV1 = SWRV2 = SWRV3; SWRV4 = SWRV5) a 97,4% (SWRV1, SWRV2 e SWRV3 com ambas, SWRV4 e SWRV5) enquanto que frente às demais H1 do GenBank, a maior identidade foi entre as SWRV4, 5, e 6 e as amostras suínas Gottfried (GU199491) e CMP034 (DQ916134) (Quadro 5). No caso da NSP6, em termos de nucleotídeos constatou-se 100% de identidade para SWRV1 = SWRV2 = SWRV3 e para SWRV4 = SWRV5, enquanto que a maior diferença observada (2,6%) foi entre as amostras SWRV1, 2, 3 e as SWRV4, 5, 6. Em relação às demais do GenBank, SWRV6 teve 98,9% de identidade com as amostras suínas PRG942 e PRG9235 (JF796722 e JF796700, respectivamente), ao passo que a menor similaridade (91,3%) foi para as amostras SWRV4, 5 e 6 com AY769694 e EF185863, ambas de origem humana (Quadro 4).

A identidade em termos de aminoácidos para NSP6 variou de 100% (SWRV1 = SWRV2 = SWRV3; SWRV4 = SWRV5) a 93,4% (SWRV1, SWRV2 e SWRV3 com ambas, SWRV4 e SWRV5), enquanto que entre as amostras aqui geradas e as demais do GenBank, a amostra SWRV6 mostrou-se idêntica à JF796722, também de origem suína (Quadro 6).

Estudos conduzidos por Eichwald et al. (2002) e Sotelo et al. (2010) demonstraram a existência de nove locais de fosforilação na NSP5, todos relacionados a resíduos de *serina*, nas posições 2, 4, 30, 37, 42, 56, 67, 101, 127 e 163 do gene. Jiang et al. (2006) afirmam que a serina 163 é fundamental para a interação com a NSP2, muito provavelmente por ser este o local de maior nível de fosforilação (SOTELO et al., 2010), o que aumentaria a afinidade da NSP5 pela NSP2 por aumentar as cargas negativas entre elas. Considerando o exposto, observou-se que os resíduos de serina, inclusive da posição 163, estão conservados dentre as amostras do presente estudo, exceto para a serina da posição 37 (S37N) (Figura 5). Todavia, segundo Sotelo et al. (2010), algumas isoformas da NSP5 podem não apresentar os sítios de fosforilação nos resíduos 30 e/ou 37 e, consequentemente, a serina estará ausente nestes locais, porém sem alterar o processo de fosforilação.

Esona et al. (2009) ao analisarem amostras africanas pertencentes ao genotipo G8, demonstraram que em seis delas os genes VP7, NSP2, e NSP5 tiveram alta identidade com amostras animais (entre 83-99% e 97-99%, nucleotídica e de aminoácidos, respectivamente).

Mukherjee et al. (2009) caracterizaram uma amostra humana G9P[6] isolada de uma criança na Índia e verificaram identidade, em termos de aminoácido, de 94.9% com a amostra suína YM, para o gene da NSP5. No caso da NSP2, a amostra em questão apresentou proximidade filogenética com outra humana (RMC321), mas derivada de suíno, e ainda, em ambos os casos foram definidos os genotipos N1 e H1, comumente descritos em suínos.

Adicionalmente, outros estudos relatam a ocorrência dos genotipos N1 e H1 em amostras humanas (MATTHIJNSSENS et al., 2006; MATTHIJNSSENS et al., 2008; MARTELLA et al., 2010; WAKUDA et al., 2011), e a detecção destes mesmos genotipos nas amostras suínas do presente estudo sugere a hipótese de haver uma interação dinâmica entre os rotavírus de origem humana e animal, em que provavelmente os genes NSP2 e NSP5 sejam oriundos de uma introdução zoonótica, o que deveria ser levado em conta ao se considerarem estratégias vacinais em humanos.

Torna-se, portanto, necessário o monitoramento de rebanhos suínos e bovinos, bem como das populações humanas, de modo a se detectarem e/ou prevenirem tais situações de possível infecção cruzada (STEYER et al., 2008), bem como eventos de reestruturação (reassortants), pois estes estão envolvidos com o surgimento de epidemias em crianças (TANIGUCHI et al., 1989, 1990).

No tocante à conservação genotípica das amostras deste estudo, a baixa taxa de variabilidade observada para a NSP2 e NSP5/6 reflete uma característica intrínseca das proteínas não estruturais de qualquer outro agente viral, ou seja, são geralmente muito estáveis (conservadas), por conta de limitações funcionais e estruturais, e pela menor exposição ao sistema imunológico (TANIGUCHI; URASAWA, 1995). No entanto, um maior número de amostras neste estudo poderia evidenciar melhor este fato.

Por fim, considerando que as enterites virais representam um fator de desequilíbrio para saúde pública e animal, aliado ao fato de que são escassos estudos visando à caracterização e análise da NSP2 e NSP5 em suínos no Brasil, justifica-se a importância deste trabalho como uma fonte de informações úteis para o entendimento, prevenção e controle das rotaviroses, proporcionando uma vigilância mais abrangente dos rotavírus, especialmente quanto ao seu caráter zoonótico, uma vez que os suínos são considerados como um dos principais reservatórios para a diversidade genética dos vírus humanos (MARTELLA et al., 2010). Além disso, abre perspectivas para o desenvolvimento de estudos que correlacionem a expressão dessas proteínas com a resposta do sistema imune, bem como a evolução clínica dos quadros de rotavirose, visando determinar se elas poderiam ser utilizadas nas formulações vacinais, juntamente à VP4 e VP7, o que aumentaria o espectro de ação e, consequentemente, a eficácia dos programas de vacinação.

7 CONCLUSÕES

As conclusões deste trabalho são as seguintes:

- Foi detectada a circulação dos genotipos N1 e H1 de NSP2 e NSP5, respectivamente, nas amostras de rotavírus suínos no Estado de São Paulo, em concordância com descrições prévias nesta espécie em diferentes regiões do mundo.
- As amostras circulantes apresentam elevada conservação nucleotídica (86,4 a 100% para NSP2 e 95,1 a 100% para NSP5) e de aminoácidos (91,5 a 100% para NSP2 e 97,4 a 100% para NSP5).
- Fica proposta uma genealogia com base nas sequências nucleotídicas dos genes codificadores da NSP2 e NSP5, com topologia compatível aos genotipos previamente descritos na literatura.

REFERÊNCIAS

ABIPECS: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA PRODUTORA E EXPORTADORA DE CARNE SUÍNA. 2011. Disponível em: http://www.abipecs.org.br/. Acesso em: 06 Dez. 2012.

AFRIKANOVA, I.; FABBRETTI, E.; MIOZZO, M.; BURRONE, O. Rotavirus NSP5 phosphorylation is up-regulated by interaction with NSP2. **Journal of General Virology**, v.79, p. 2679–2686, 1998.

ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A. F.; FREITAS, J. C.; SILVA, C. A.; FREIRE, R. L.; BARROS, A. R.; BARREIROS, M. A. B.; MULLER, E. E. Ocorrência de Escherichia coli, Rotavírus, Picobirnavírus e Cryptosporidium parvum em um foco de diarréia do pós-desmame em suínos. **Seminário de Ciências Agrárias**, v. 15, p. 5-7, 1994.

ALFIERI, A. A.; LEITE, J. P. G.; NAKAGOMI, O.; KAGA, E.; WOODS, P. A.; GLASS, R. I.; GETSCH, J. R. Characterisation of human rotavirus genotype P[8]G5 from Brazil by probehybridisation and sequence. **Archives of Virology**, v. 141, p. 2353–2364, 1996.

ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A. F.; BEUTTEMMÜLLER, E. A. Rotavirose suína: tópicos sobre etiologia, infecção e controle. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 20, n. 1, p. 90-97, 1999a.

ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A. F.; BEUTTEMMÜLLER, E. A.; BRITO, B. G.; MÉDICI, K. C. Aspectos epidemiológicos da rotavirose suína na região sudoeste do Estado do Paraná, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 20, p. 5-11, 1999b.

ASANO, K. M.; SOUZA, S. P.; SILVA, S. O. S.; RICHTZENHAIN, L. J.; BRANDÃO, P. E. Detecção rápida do Coronavírus Bovino (BCoV) por meio de uma semi-nested RT-PCR. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 29, n. 11, p. 869-73, 2009.

AZEVEDO, A. S.; YUAN, L.; JEONG, K. I. Viremia and nasal and rectal shedding of rotavirus in gnotobiotic pigs inoculated with Wa human rotavirus. **Journal of Virology**, v. 79, p. 5428-5436, 2005.

BALL, J. M.; MITCHELL, D. M.; GIBBONS, T. F. Rotavirus NSP4: A multifunctional viral enterotoxin. **Viral Immunology**, v. 18, p. 27-40, 2005.

BANYAI, K.; ESONA, M. D.; KERIN, T. K.; HULL, J. J.; MIJATOVIC, S.; VASCONEZ, N. Molecular characterization of a rare, human-porcine reassortant rotavirus strain, G11P[6], from Ecuador. **Archives of Virology**, v. 154, p. 1823–1829, 2009.

BAR-MAGEN, T.; SPENCER, E.; PATTON, J. T. An ATPase activity associated with the rotavirus phosphoprotein NSP5. **Virology**, v. 369, p. 389-399, 2007.

BARREIROS, M. A.; ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A. F.; MEDICI, K. C.; LEITE, J. P. An outbreak of diarrhoea in one week-old piglets caused by group A rotavirus genotypes P[7], G3 and P[7], G5. Veterinary Research Communication, v. 27, n. 6, p. 505-512, 2003.

BERKOVA, Z.; CRAWFORD, S. E.; TRUGNAN, G. Rotavirus NSP4 induces a novel vesicular compartment regulated by calcium and associated with viroplasms. **Journal of Virology**, Houston, n. 12, v. 80, p. 6061-6071, 2006.

BEROIS, M.; SAPIN, C.; ERK, I.; PONCET, D.; COHEN, J. Rotavirus nonstructural protein NSP5 interacts with major core protein VP2. **Journal of Virology**, v. 77, p. 1757–1763, 2003.

BOK, K.; PALACIOS, G.; SIJVARGER, K.; MATSON, D.; GOMEZ, J. Emergence of G9 P[6] human rotaviruses in Argentina: phylogenetic relationships among G9 strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 4020-4025, 2001.

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

CAMPAGNA, M.; EICHWALD, C.; VASCOTTO, F.; BURRONE, O. R. RNA interference of rotavirus segment 11 mRNA reveals the essential role of NSP5 in the virus replicative cycle. **Journal of General Virology**, v. 86, p.1481-1487, 2005.

CAMPAGNA, M.; BURRONE, O. R. Fusion of tags induces spurious phosphorylation of rotavirus NSP5. Journal of General Virology, v. 80, p. 8284-8285, 2006.

CAO, D.; BARRO, M.; HOSHINO, Y. Porcine rotavirus bearing an aberrant gene stemming from na intergenic recombination of the NSP2 and NSP5 genes is defective and interfering. **Journal of Virology**, v. 82, n. 12, p. 6073-6077, 2008.

CARMONA, R. C.; TIMENETSKY, M. D. O. C.; DA SILVA, F. F.; GRANATO, C. F. Characterization of rotavirus strains from hospitalized and outpatient children with acute diarrhoea in Sao Paulo, Brazil. **Journal of Medical Virology**, v. 74, n. 1, p. 166-172, 2004.
CARPIO, R. V., GONZALEZ-NILO, F. D., JAYARAM, H., SPENCER, E., PRASAD, B. V., PATTON, J. T., TARAPOREWALA, Z. F. Role of the histidine triad-like motif in nucleotide hydrolysis by the rotavirus RNA-packaging protein NSP2. **The Journal of Biological Chemistry.**, v. 279, p. 10624–10633, 2004.

CARREÑO-TORRES, J. J.; GUTIÉRREZ, M.; ARIAS, C. F., LÓPEZ, S.; ISA, P. Characterization of viroplasm formation during the early stages of rotavirus infection. **Virology Journal**, v. 7, p. 350, 2010.

CARTER, J. B.; SAUNDERS, V. A. Reoviroses. In: CARTER, J. B.; SAUNDERS, V. A. **Virology:** principles and applicantions. 3. ed. Liverpool: John Wiley & Sons, Ltd, 2007. Cap. 13, p. 147-158.

CHANG, K. O.; PARWANI, A. V.; SMITH, D.; SAIF, L. J. Detection of group B rotavirus in fecal samples from diarrheic calves and adult cows and characterization of their VP7 genes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 8, p. 2107-2110, 1997.

CHEN, D.; RAMIG, R. F. Rescue of infectivity by in vitro transcapsidation of rotavirus singleshelled particles. **Virology**, v. 192, p. 422-429, 1993.

CIARLET, M.; ESTES, M. K.; CONNER, M. E. Simian rhesus rotavirus is a unique heterologous (non-lapine) rotavirus strain capable of productive replication and horizontal transmission in rabbits. **Journal of General Virology**, v. 81, p. 1237–1249, 2000.

CONTIN, R.; ARNOLDI, F.; CAMPAGNA, M.; BURRONE, O. R. Rotavirus NSP5 orchestrates recruitment of viroplasmic proteins. **Journal of General Virology**, v. 91, n. 7, p. 1782-1793, 2010.

COOK, N.; BRIDGER, J.; KENDALL, K.; GOMARA, M. I.; EL-ATTAR, L.; GRAY, J. The zoonotic potential of rotavirus. **Journal of Infection**, v. 48, p. 289-302, 2004.

CUNLIFFE, N. A.; GONDWE, J. S.; BROADHEAD, R. L.; MOLYNEUX, M. E.; WOODS, P. A.; BRESEE, J. S.; GLASS, R. I.; GENTSCH, J. R.; HART, C. A. Rotavirus G and P types in children with acute diarrhea in Blantyre, Malawi, from 1997 to 1998: predominance of novel P[6]G8 strains. **Journal of Medical Virology**, v. 57, p. 308–312, 1999.

DAS, B. K.; GENTSCH, J. R.; CICIRELLO, H. G.; WOODS, P. A.; GUPTA, A.; RAMACHANDRAN, M.; KUMAR, R.; BHAN, M. K.; GLASS, R. I. Characterization of rotavirus strains from newborns in New Delhi, India. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, p. 1820–1822, 1994. DESSELBERGER, U. Genome rearrangements of rotaviruses. Advances in Virus Research, v. 46. p. 69-95, 1996.

DESSELBERGER, U.; ITURRIZA-GO'MARA, M.; GRAY, J. Rotavirus epidemiology and surveillance. **Novartis Foundation Symposiun**, v. 238, p. 125–147, 2001.

DEWEY, C.; CARMAN, S.; PASMA, T.; JOSEPHSON, G.; MCEWEN, B. Relationship between group A porcine rotavirus and management practices in swine herds in Ontario. **Canadian Veterinary Journal**, v. 44, n. 8, p. 649-653, 2003.

DYALL-SMITH, M. L.; ELLEMAN, T. C.; HOYNE, P. A.; HOLMES, I. H.; AZAD, A. A. Cloning and sequence of UK bovine rotavirus gene segment 7: Marked sequence homology with simian rotavirus gene segment 8. **Nucleic Acids Research**, v. 11, p. 3351-3362. 1983.

EICHWALD, C.; VASCOTTO, F.; FABBRETTI, E.; BURRONE, O. R. Rotavirus NSP5: Mapping Phosphorylation Sites and Kinase Activation and Viroplasm Localization Domains. **Journal of Virology**, v. 76, p. 3461–3470, 2002.

EICHWALD, C.; RODRIGUEZ, J. F.; BURRONE, O. R. Characterization of rotavirus NSP2/NSP5 interactions and the dynamics of viroplasm formation. **Journal of General Virology**, v. 85, p. 625-634, 2004a.

EICHWALD, C.; JACOB, G.; MUSZYNSKI, B.; ALLENDE, J.E.; BURRONE, O.R. Uncoupling substrate and activation functions of rotavirus NSP5: phosphorylation of Ser-67 by casein kinase 1 is essential for hyperphosphorylation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of American.** v. 101, p. 16304–16309, 2004b.

ESONA, M. D.; GEYER, A.; PAGE, N.; TRABELSI, A.; FODHA, I.; AMINU, M.; AGBAYA, V. A.; TSION, B.; KERIN, T. K.; ARMAH, G. E.; STEELE, A. D.; GLASS, R. I.; GENTSCH, J. R. Genomic characterization of human rotavirus G8 strains from the African rotavirus network: relationship to animal rotaviruses. **Journal of Medical Virology**, v. 81, p. 937-951, 2009.

ESTES, M. K. Rotaviruses and their replication. In: KNIPE, D. M., HOWLEY, P. M. Fields virology. 4. ed. Philadelphia: Lippincott ,Williams & Wilkins, 2001. p. 1747-1785.

ESTES, M. K.; KAPIKIAN, A. Z. Rotaviruses. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, P. M.; HOWLEY, P. M. (Ed.). **Fields virology**. 5. ed. Filadélfia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. p. 1917-1973.

FABBRETTI, E.; AFRIKANOVA, I.; VASCOTTO, F.; BURRONE, O. Two non-structural rotavirus proteins, NSP2 and NSP5, form viroplasm-like structures in vivo. **Journal of General Virology**, v. 80, p. 333–339, 1999.

FAUQUET, C. M.; MAYO, M. A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L. A. (Ed.). **The eighth report of the international committee on taxonomy of viruses**. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005. p. 947-955.

FENG, N.; BURNS, J. W.; BRACY, L.; GREENBERG, H. B. Comparison of mucosal and systemic humoral immune responses and subsequent protection in mice orally inoculated with a homologous or a heterologous rotavirus. **Journal of Virology**, v. 68, p. 7766–7773, 1994.

FLORES, J.; SEARS, J.; GREEN, K. Y.; PEREZ-SCHAEL, I.; MORANTES, A.; DAOUD, G.; GORZIGLIA, M.; HOSHINO, Y.; CHANOCK, R. M.; KAPIKIAN, A. Z. Genetic stability of rotaviruses recovered from asymptomatic neonatal infections. **Journal of Virology**, v. 62, n. 12, p. 4778-4781, 1988.

FUKAI, K., SAKAI, T., HIROSE, M., ITOU, T. Prevalence of calf diarrhea caused by bovine group a rotavirus carrying G serotype 8 specificity. **Veterinary Microbiology**, v. 66, p. 301-311, 1999.

GENTSCH, J. R.; DAS B. K.; JIANG B.; BAHN M. K.; GLASS R. I. Similarity of the VP4 protein of human rotavirus strain 116E to that of the bovine B223 strain. **Virology**, v. 194, p. 424–430, 1993.

GENTSCH, J. R.; WOODS, P. A.; RAMACHANDRAN, M.; DAS, B. K.; LEITE, J. P.; ALFIERI, A.; KUMAR, R.; BHAN, M. K.; GLASS, R. I. Review of G and P typing results from a global collection of rotavirus strains: implications for vaccine development. **Journal of Infectious Diseases**, v. 174, p. 30–36, 1996.

GHOSH, S.; VARGHESE, V.; SAMANJDAR, S.; BHATTACHARYA, S. K.; KOBAYASHI, N.; NAIK, T. N. Evidence for independent segregation of the VP6- and NSP4- encoding genes in porcine group A rotavirus G6P[13] strains. **Archives of Virology**, v. 152, p. 423-429, 2007.

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

GORZIGLIA, M.; NISHIKAWA, K.; FUKUHARA, N. Evidence of duplication and deletion in super short segment 11 of rabbit rotavirus Alabama strain. **Virology**, v. 170, p. 587-590, 1989.

GOUVEA, V.; SANTOS, N.; TIMENETSKY, M. C. Identification of bovine and porcine rotavirus G types by PCR. Journal of Clinical Microbiology, v. 32, p. 1338-1340, 1994.

GOUVEA, V.; BRANTLY, M. Is rotavirus a population of reassortants? **Trends in Microbiology.** v. 3, n. 4, p. 159-162, 1995.

GREGORI, F.; ROSALES, C. A. R.; BRANDÃO, P. E.; SOARES, R. M.; JEREZ, J. A. Diversidade genotípica de rotavírus suínos no Estado de São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, p. 707-712, 2009.

GRIFFIN, D. D.; NAKAGOMI, T.; HOSHINO, Y.; NAKAGOMI, O. C.; KIRKWOOD, D.; PARASHAR, U. D.; GLASS R. I.; GENTSCH J. R. Characterization of nontypable rotavirus strain from the United States: identification of a new rotavirus reassortant (P2A[6],G12) and rare P3[9] strains related to bovine rotaviruses. **Virology**, v. 294, n. 2, p. 256-269, 2002.

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

HEIMAN, E. M.; MCDONALD, S. M.; BARRO, M.; TARAPOREWALA, Z. F.; BAR-MAGEN, T.; PATTON, J. T. Group A human rotavirus genomics: evidence that gene constellations are influenced by viral protein interactions. **Journal of Virology**, v. 82, n. 22, p. 11106–11116, 2008.

HOPKINS, R. S.; GASPARD, B.; WILLIAMS, F. P.; KARLIN, R. J.; CUKOR, G.; BLACKLOW, N. R. A community waterborne gastroenteritis outbreak: evidence for rotavirus as the agent. **American Journal of Public Health**, v. 74, p. 263–265, 1984.

HOSHINO, Y.; SAIF, L. J.; KANG, S. Y. Identification of group A rotavirus genes associated with virulence of a porcine rotavirus and host range restriction of a human rotavirus in the gnotobiotic piglet model. **Virology**, v. 209, p. 274-280, 1995.

HUNDLEY, F.; BIRYAHWAHO, B.; DESSELBERGER, U. Genome rearrangements of bovine rotavirus after serial passage at high multiplicity of infection. **Virology** v. 143, p. 88-103, 1985.

HUNDLEY, F.; MCINTYRE, M.; CLARK, B.; BEARDS, G.; WOOD, D.; CHRYSTIE, I.; DESSELBERGER, U. Heterogeneity of genome rearrangements in rotaviruses isolated from a chronically infected immunodeficient child. **Journal of Virology**, v. 61, p. 3365-3372, 1987.

HUSSEIN, H. A.; PARWANI, A. V.; ROSEN, B. I.; LUCCHELLI, A.; SAIF, L. J. Detection of rotavirus serotypes G1, G2, G3 and G11 in feces of diarrheic calves by using polymerase chain reaction-derived cDNA probes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, p. 2491-2496, 1993.

ING, D. J., GLASS, R. I.; WOODS, P. Immunogenicity of tetravalent rhesus rotavirus vaccine administered with buffer and oral polio vaccine. **American Journal of Diseases of Children**, v. 145, p. 892-897, 1991.

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

JIANG, X.; JAYARAM, H.; KUMAR, M.; LUDTKE, S.J.; ESTES, M.K.; PRASAD, B.V. Cryoelectron microscopy structures of rotavirus NSP2-NSP5 and NSP2-RNA complexes: implications for genome replication. **Journal of Virology**, v. 80, n. 21, p. 10829–10835, 2006.

KAPIKIAN, A. Z.; FLORES, J.; GREEN, K. Y. Prospects for development of a rotavirus vaccine against rotavirus diarrhoea by a Jennerian and a modified Jennerian strategy. **Archives of Virology Supplementum**, v. 12, p. 163 - 175, 1996.

KAPIKIAN, A. Z.; HOSHINO, Y.; CHANOCK; R. M. Rotaviruses. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M.; GRIFFIN, D. E.; LAMB, R. A.; MARTIN, M. A.; ROIZMAN, B.; STRAIS, S. E. **Fields virology**. 4. ed. Philadelphia: Lipincott William and Wilkins, 2001. p. 1787–1833.

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

KHAMRIN, P.; MANEEKARN, N.; PEERAKOME, S.; MALASAO, R.; THONGPRACHUM, A.; CHAN-IT, W.; MIZUGUCHI, M.; OKITSU, S.; USHIJIMA, H. Molecular characterization of VP4, VP6, VP7, NSP4, and NSP5/6 genes identifies an unusual G3P[10] human rotavirus strain. **Journal of Medical Virology**, v. 81, p. 176-182, 2009. KHAMRIN, P.; MANEEKARN, N.; MALASAO, R.; NGUYEN, T. A.; ISHIDA, S.; OKITSU, S.; USHIJIMA, H. Genotypic linkages of VP4, VP6, VP7, NSP4, NSP5 genes of rotaviruses circulating among children with acute gastroenteritis in Thailand. **Infection**, **Genetic and Evolution**, v. 10, n. 4, p. 467-472, 2010.

KING, A. M. Q.; ADAMS, M. J.; CARSTENS, E. B.; LEFKOWITZ, E. J. (Ed.). Virus **Taxonomy: classification and nomenclature of viruses.** 9. ed. San Diego: Elsevier Academic Press, 2012. 1272 p.

KOOPMANS, M.; DUIZER, E. Foodborne viruses: an emerging problem. **International Journal of Food Microbiology**, n. 90, p. 23-41, 2004.

KUMAR, M.; JAYARAM, H.; VASQUEZ-DEL CARPIO, R.; JIANG, X.; TARAPOREWALA, Z. F.; JACOBSON, R. H.; PATTON, J. T.; PRASAD, B. V. V. Crystallographic and Biochemical Analysis of Rotavirus NSP2 with Nucleotides Reveals a Nucleoside Diphosphate Kinase-Like Activity. **Journal of Virology**, v. 81, n. 22, p. 12272– 12284, 2007.

LINARES, R. C.; BARRY, A. F.; ALFIERI, A. F.; MÉDICI, K. C.; FERONATO, C.; GRIEDER, W.; ALFIERI, A. A. Frequency of Group A Rotavirus in piglet stool samples from non-vaccinated brazilian pig herds. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, p. 63-68, 2009.

LOPEZ, T.; CAMACHO, M.; ZAYAS, M.; NAJERA, R.; SANCHEZ, R.; ARIAS, C. F.; LÓPEZ, S. Silencing the morphogenesis of rotavirus. **Journal of Virology**, v. 79, n. 1, p. 184–192, 2005a.

LOPEZ, T.; ROJAS, M.; AYALA-BRETON, C.; LOPEZ, S.; ARIAS, C. F. Reduced expression of the rotavirus NSP5 gene has a pleiotropic effect on virus replication. **Journal of General Virology**, v. 86, p. 1609 -1617, 2005b.

MARTELLA, V.; CIARLET, M.; BASELGA, R.; ARISTA, S.; ELIA, G.; LORUSSO, E.; BÁNYAI, K.; TERIO, V.; MADIO, A.; RUGGERI, F. M.; FALCONE, E.; CAMERO, M.; DECARO, N.; BUONAVOGLIA, C. Sequence analysis of the VP7 and VP4 genes identifies a novel VP7 gene allele of porcine rotaviruses, sharing a common evolutionary origin with human G2 rotaviruses. **Virology**, v. 20, n. 337, p. 111-123, 2005.

MARTELLA, V.; BANYAI, K.; MATTHIJNSSENS, J.; BUONAVOGLIA, C.; CIARLET, M. Zoonotic aspects of rotaviruses. **Veterinary Microbiology**, v. 140, p. 246–255, 2010.

MATTHIJNSSENS, J.; RAHMAN, M.; MARTELLA, V.; XUELEI, Y.; DE VOS, S.; DE LEENER, K.; CIARLET, M.; BUONAVOGLIA, C.; VAN RANST, M. Full genomic analysis of human rotavirus strain B4106 and lapine rotavirus strain 30/96 provides evidence for interspecies transmission. **Journal of Virology**, v. 80, n. 8, p. 3801-3810, 2006. MATTHIJNSSENS, J. A.; CIARLET, M.; HEIMAN, E.; ARIJS, I.; DELBEKE, T.; MCDONALD, S. M.; PALOMBO, E. A.; ITURRIZA-GOMARA, M.; MAES, P.; PATTON, J. T.; RAHMAN, M.; VAN RANST, M. Full genome-based classification of rotaviruses reveals a common origin between human Wa-Like and porcine rotavirus strains and human DS-1-like and bovine rotavirus strains. **Journal of Virology**, v. 82, p. 3204-3219, 2008.

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

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

MATTION, N.; GONZALEZ, S. A.; BURRONE, O.; BELLINZONI, R.; LA TORRE, J. L.; SCODELLER, E. A. Rearrangement of genomic segment 11 in two swine rotavirus strains. **Journal of General Virology**, v. 69, p. 695-698, 1988.

MÉDICI, K. C.; BARRY, A. F.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Genetic analysis of the porcine group B rotavirus NSP2 gene from wild-type Brazilian strains. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 43, n. 1, p. 13-16, 2010.

MÉDICI, K. C.; BARRY, A. F.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Porcine rotavirus groups A, B, and C identified by polymerase chain reaction in a fecal sample collection with inconclusive results by polyacrylamide gel electrophoresis. **Journal o 146 f Swine Health and Production**, v. 19, n. 3, p. 146-150, 2011.

MELIN, L.; MATTSSON, S.; KATOULI, M.; WALLGREN, P. Development of postweaning diarrhoea in piglets. Relation to presence of Escherichia coli strain and Rotavirus. **Journal of Veterinary Medicine B**, v. 51, p. 12-22, 2004.

MUKHERJEE, A.; DUTTA, D.; GHOSH, S.; BAGCHI, P.; CHATTOPADHYAY, S.; NAGASHIMA, S.; KOBAYASHI, N.; DUTTA, P.; KRISHNAN, T.; NAIK, T. N.; CHAWLA-SARKAR, M. Full genomic analysis of a human group A rotavirus G9P[6] strain from Eastern India provides evidence for porcine-to-human interspecies transmission. **Archives of Virology**, v. 154, n. 5, p. 733-746, 2009.

NAKAGOMI, O.; ISEGEWA, Y.; WARD, R. L.; KNOWLTON, D. R.; KAGA, E.; NAKAGOMI, T.; UEDA, S. Naturally occurring dual infection with human and bovine rotaviruses as suggested by the recovery of G1P8 and G1P5 rotaviruses from a single patient. **Archives of Virology**, v. 137, p. 381–388, 1994.

NISHIDA, M. K.; RUIZ, V. L. A.; GREGORI, F. Detection of rotavirus from pig livestock wastewater of São Paulo State, Brazil. **Ars Veterinaria**, v. 25, n. 3, p. 136-141, 2009.

OFFIT, P. A.; BLAVAT, G. Identification of the two rotavirus genes determining neutralization specificities. **Journal of Virology**, v. 57, n. 1, p. 376-378, 1986.

PAHO: PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. Rotaviral Gastroenteritis. In: **Zoonoses and communicable diseases common to man and animals:** Chlamydioses, rickettsioses and viroses. 3. ed. Washington: PAHO, 2001. p. 286-294.

PARASHAR, U. D.; BRESEE J. S.; GENTSCH J. R.; GLASS R. I. 1998. Rotavirus. **Emerging Infectious Diseases**, v. 5, p. 561–570, 1998.

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

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

PARRA, G. I.; BOK, K.; MARTÍNEZ, M.; GOMEZ, J. A. Evidence of rotavirus intragenic recombination between two sublineages of the same genotype. **Journal of General Virology**, v. 85, n. 6, p. 1713-1716, 2004.

PARRA, G. I.; VIDALES, G.; GOMEZ, J. A.; FERNANDEZ, F. M.; PARREÑO, V.; BOK, K. Phylogenetic analysis of porcine rotavirus in Argentina: Increasing diversity of G4 strains and evidence of interspecies transmission. **Veterinary Microbiology**, v. 126, n. 1/3, p. 243-250, 2008.

PATTON, J. T.; SALTER-CID, L.; KALBACH, A.; MANSELL, E. A.; KATTOURA, M. Nucleotide and amino acid sequence analysis of the rotavirus nonstructural RNA-binding protein NS35. **Virology**, v. 192 p. 438–446, 1993.

PATTON, J. T.; SPENCER, E. Genome replication and packaging of segmented doublestranded RNA viruses. **Virology**, v. 277, n. 2, p. 217-225, 2000. PATTON, J. T.; VASQUEZ-DEL CARPIO, R.; TORTORICI, M. A.; TARAPOREWALA, Z. F. Coupling of rotavirus genome replication and capsid assembly. **Advances in Vírus Research**, v. 69, p. 167–201, 2007.

PEDLEY, S.; HUNDLEY, F.; CHRYSTIE, I.; MCCRAE, M. A.; DESSELBERGER, U. The genomes of rotaviruses isolated from chronically infected immunodeficient children. **Journal of General Virology**, v. 65, p. 1141-1150. 1984.

PIRON, M.; DELAUNAY, T.; GROSCLAUDE, J.; PONCET, D. Identification of the RNA binding, dimerization, and eIF4GI-binding domains of rotavirus nonstructural protein NSP3. **Jounal of Virology**, v. 73, p. 5411–5421, 1999.

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

RUSHLOW, K.; McNAB, A.; OLSON, K.; MAXWELL, F.; MAXWELL, I.; STIEGLER, G. Nucleotide sequenceof porcine rotavirus (OSU strain) gene segments 7, 8 e 9. Nucleic Acids Res., v. 16, p. 367, 1988.

SAIF, L. J.; JIANG, B. Nongroup A Rotaviruses of Humans and Animals. Current Topics Microbiologycal Immunology, v.185, p.339-371, 1994.

SAIF, L. J.; ROSEN, B.; PARWANI, A. Animal Rotaviruses. In: KAPIKIAN, A. (Ed.). Viral infections of the gastrointestinal tract. New York: Marcel Dekker, Inc, 1994. p. 279–367.

SALEM, A. N. B.; SERGEI, A. C.; OLGA, P. B.; OLGA, G. A.; MAHJOUBB, A.; LARISSA, B. P. Multiplex nested RT-PCR for the detection of porcine enteric viruses. **Journal Virology Methods**, v. 165, n. 2, p. 283-293, 2010.

SAMANIEGO-HERNÁNDEZ, M.; LEÓN-RODRÍGUEZ, A.; APARICIO-FABRE, R.; ARIAS-ORTIZ, C.; BARBA DE LA ROSA, A. P. Expression and purification of rotavirus proteins NSP5 and NSP6 in *Escherichia coli*. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 44, p. 336-341, 2006.

SCHUCK, P.; TARAPOREWALA, Z.; MCPHIE, P.; PATTON, J. T. Rotavirus nonstructural protein NSP2 self-assembles into octamers that undergo ligand-induced conformational changes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 13, p. 9679-9687, 2001.

SEN, A.; AGRESTI, D.; MACKOW E. R. Hyperphosphorylation of the rotavirus NSP5 protein is independent of serine 67 or NSP2, and the intrinsic insolubility of NSP5 is regulated by cellular phosphatases. **Journal of Virology**, v. 80, p. 1807-1816, 2006.

SEN, A.; SEN, N.; MACKOW, E. R. The Formation of Viroplasm-Like Structures by the Rotavirus NSP5 Protein Is Calcium Regulated and Directed by a C-Terminal Helical Domain. **Journal of Virology**, v. 81, n. 21, p. 11758–11767, 2007.

SILVA, F. D. F.; GREGORI, F.; GONÇALVES, A. C. S.; SAMARA, S. I.; BUZINARO, M. G. Molecular characterization of group A bovine rotavirus in southeastern and central-western Brazil, 2009-2010. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 3, p. 237-242, 2012.

SILVESTRI, L. S.; TARAPOREWALA, Z. F.; PATTON, J. T. Rotavirus replication: plussense templates for double-stranded RNA synthesis are made in viroplasms. **Journal of Virology**, v. 78, p. 7763-7774, 2004.

SIMON-LORIERE, E.; HOLMES, E. C. Why do RNA viruses recombine? Nature Reviews Microbiology, v. 9, n. 8, p. 617-626, 2011.

SOTELO, P. H.; SCHÜMANN, M.; KRAUSE, E.; CHNAIDERMAN, J. Analysis of rotavirus non-structural protein NSP5 by mass spectrometry reveals a complex phosphorylation pattern. **Virus Research**, v. 149, p. 104–108, 2010.

STEYER, A.; POLJSAK-PRIJATELJ, M.; BARLIC-MAGANJA, D.; JAMNIKAR, U.; MIJOVSKI, J. Z.; MARIN, J. Molecular characterization of a new porcine rotavirus P genotype found in an asymptomatic pig in Slovenia. **Virology**, v. 359, n. 2, p. 275-282, 2007.

STEYER, A.; POLJSAK-PRIJATELJ, M.; BARLIC-MAGANJA, D.; MARIN, J. Human, porcine and bovine rotaviruses in Slovenia: evidence of interspecies transmission and genome reassortment. **Journal of General Virology**, v. 89, p. 1690–1698, 2008.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, n. 10, p. 2731–2739. 2011.

TANIGUCHI, K.; NISHIKAWA, K.; URASAWA, T.; URASAWA, S.; MIDTHUN, K.; KAPIKIAN, A. Z.; GORZIGLIA, M. Complete nucleotide sequence of the gene encoding VP4 of a human rotavirus (strain K8) which has unique VP4 neutralization epitopes. **Journal of Virology**, v. 63, p. 4101-4106, 1989.

TANIGUCHI, K.; URASAWA, T.; KOBAYASHI, N.; GORZIGLIA, M.; URASAWA, S. Nucleotide sequence of VP4 and VP7 genes of human rotaviruses with subgroup I specificity and long RNA pattern: Implication for new G serotype specificity. **Journal of Virology**, v. 64, p. 5640-5644, 1990.

TANIGUCHI, K.; URASAWA, S. Diversity in rotavirus genomes. **Seminars in Virology**, v. 6, p. 123-131, 1995.

TARAPOREWALA, Z. F.; PATTON, J. T. Identification and Characterization of the Helix-Destabilizing Activity of Rotavirus Nonstructural Protein NSP2. **Journal of Virology**, v. 75, n. 10, p. 4519-4527, 2001.

TARAPOREWALA, Z. F.; CHEN, D.; PATTON, J. T. Multimers formed by the rotavirus nonstructural protein NSP2 bind to RNA and have nucleoside triphosphatase activity. **Journal of Virology**, v. 73, n. 12, p. 9934–9943, 1999.

TATE, J. E.; BURTON, A. H.; BOSCHI-PINTO, C.; STEELE, A. D.; DUQUE, J.; PARASHAR, U. D.; WHO-coordinated Global. Rotavirus Surveillance Network 2008 estimate of worldwide rotavirus-associated mortality in children younger than 5 years before the introduction of universal rotavirus vaccination programmes: a systematic review and meta-analysis. Lancet Infectious Diseases, v. 12, n. 2, p. 136–141, 2012.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL, W. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, n. 22, p. 4673-4680, 2004.

TSUGAWA, T.; HOSHINO, Y. Whole genome sequence and phylogenetic analyses reveal human rotavirus G3P[3] strains Ro1845 and HCR3A are examples of direct virion transmission of canine/feline rotaviruses to humans. **Virology**, v. 230, p. 344–353, 2008.

VANNUCCI, F. A.; GUEDES, R. M. C. Fisiopatologia das diarréias em suínos. **Revista Ciência Rural,** Santa Maria, v. 39, n. 7, p. 1-10, 2009.

VENDE, P.; PIRON, M.; CASTAGNE, N.; PONCET, D. Efficient translation of rotavirus mRNA requires simultaneous interaction of NSP3 with the eukaryotic translation initiation factor eIF4G and the mRNA 3' end. **Journal of Virology**, v. 74, n. 15, p. 7064–7071, 2000.

VENDE, P.; TARAPOREWALA, Z. F.; PATTON, J. T. RNA-binding activity of the rotavirus phosphoprotein NSP5 includes affinity for double-stranded RNA. Journal of Virology, v. 76, p. 5291–5299, 2002.

WAKUDA, M.; IDE, T.; SASAKI, J.; KOMOTO, S. ISHII, J.; SANEKATA, T.; TANIGUCHI, K. Porcine Rotavirus Closely Related to Novel Group of Human Rotaviruses. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 8, p. 1491-1493, 2011.

WEN, Y. L.; LI, C, Y.; FAN, Y. C.; ZHANG, Y.; WEI, H. T.; CHEN, Y. D. NSP5/NSP6 of rotavirus strain TB-Chen and preliminary genotyping analysis, **Bing Du Xue Bao**, v. 25, n. 5, p. 349-354, 2009.

WHO: WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guidelines for the safe use of wastewater, excreta and greywater. 3. ed. Genebra: World Health Organization, 2006.

WIELER, L. H.; LLIEFF, A.; HERBEST, W.; BAUER, C.; VIELER, E.; BAUERFEIND, R.; FAILING, K.; KLOS, H.; WENGERT, D.; BALJER, G.; ZAHNER, H. Prevalence of enteropathogens in suckling and weaned piglets with diarrhoea in Southern Germany. **Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health**, v. 48, n. 2, p. 151-159, 2001.

ZELLER, M.; HEYLEN, E.; DE COSTER, S.; VAN RANST, M.; MATTHIJNSSENS, J. Full genome characterization of a porcine-like human G9P[6] rotavirus strain isolated from an infant in Belgium. **Infection, Genetic and Evolution**, v. 12, n. 7, p. 1492-1500, 2012.

APÊNDICE A

As sequências nucleotídicas parciais do segmento 8 de rotavírus suínos geradas no presente estudo encontram-se relacionadas abaixo:

>SWRV1 (número de acesso KC117140)

TGCTTTTGTTATCCTCATTTGGAGAACGATAGCTATAAATTTATTCCTTTTAATAATTTGGC AATAAAATGCATGTTGACAGCAAAAGTAGACAAAAAAGATCAAGATAAATTTTATAATT CAATTGTTTATGGGATTGCGCCACCTCCACAGTTTAAGAAACGTTATAATACCAATGATA ATTCAAGGGGTATGAATTTTGAGACATCCATGTTTAATAAGGTGGCTATGTTAATCTGCG AAGCATTGAATTCAATTAAGGTTACTCAATCTGATGTTGCAAATGTTCTTTCGAGAGTAGT TTCTGTTAGACATTTAGAAAATTTGGTGCTAAGGAAAGAGAATCATCAGGATGTACTTTT TGAAACTACTGCCACTGCTGAAGGAGGAGAGAGATAGTATTCCAAAATACTGCTTTTACTAT GTGGAGACTAACATATCTAGATCATAAACTAATGCCCATTCTAGATCAAAACTTCATTGA ATACAAGATTACTCTGAATGAAGATAAACCAATTTCAGATATGTGTGTCAAAGAGCTTGT TGCTGAATTGAGATGGCAGTATAATAGATTTGCTGTGATAACACATGGTAAAGGTCACTA TAGAGTTGTTAAATATTCATCAGTTGCAAATCACGCAGATAGAGTATTCGCCACATACAA GAATAATGCTAAAAGCGGTAATATTACTGATTTTAATTTACTAGACCAAAGAATAATTTG GCAAAATTGGTACGCATTTACATCCTCTATGAAACAAGGTAATACTCTTGACGTATGCAA GAAACTACTCTTCCAAAAGATGAAACAAGAGAAGAACCCATTTAAAGGATTGTCAACTG ATAGAAAAATGG

>SWRV2 (número de acesso KC117141)

TATCCTCATTTGGAGAACGATAGCTATAAATTTATTCCTTTTAATAATTTGGCAATAAAAT GCATGTTGACAGCAAAAGTAGACAAAAAAGATCAAGATAAATTTTATAATTCAATTGTTT ATGGGATTGCGCCACCTCCACAGTTTAAGAAACGTTATAATACCAATGATAATTCAAGGG GTATGAATTTTGAGACATCCATGTTTAATAAGGTGGCTATGTTAATCTGCGAAGCATTGA ATTCAATTAAGGTTACTCAATCTGATGTTGCAAATGTTCTTTCGAGAGTAGTTTCTGTTAG TGCCACTGCTGAAGGAGAGAGAGATAGTATTCCAAAATACTGCTTTTACTATGTGGAAACT AACATATCTAGATCATAAACTAATGCCTATTCTAGATCAAAACTTCATTGAATACAAGAT TACTCTGAATGAAGATAAACCAATTTCAGATATGTGTGTCAAAGAGCTTGTTGCTGAATT GAGATGGCAGTATAATAGATTTGCTGTGATAACACATGGTAAAGGTCACTACAGAGTTGT TAAATATTCATCAGTTGCAAATCACGCAGATAGAGTATTCGCCACATACAAGAATAATGC TAAAAGCGGTAATATTACTGATTTTAATTTACTAGACCAAAGAATAATTTGGCAAAATTG GTACGCATTTACATCCTCTATGAAACAAGGTAATACTCTTGACGTATGCAAGAAACTACT CTTCCAAAAGATGAAACAAGAGAAGAACCCATTTAAAGGATTGTCAACTGATAGAAAAA TGG

>SWRV3 (número de acesso KC117142)

TGCCACAGCTGAAGGAGGTGAAATAGTGTTTCAAAATGCTGCGTTTACTATGTGGAAATT GACGTATTTAGATCATAAATTGATGCCTATTTTAGATCAGAATTTCATTGAATATAAAGTT ACTGTAAATGAAGATAAACCAATTTCAGATGTACATGTTAAGGAGCTTGTTTCTGAACTA AGATGGCAGTACAACAAATTTGCCGTAATAACACATGGTAAAGGTCACTACAGAGTTGTT AAATATTCATCAGTTGCTAATCACGCTGATAGAGTATTCGCTACATTTAAAAATAATGCT AAGAGTGGTAATATTACTGAATTTAATCTTTTAGACCAAAGAATTATTTGGCAAAATTGG TACGCATTCACATCTTCAATGAAACAAGGTAACACTCTGGATATATGCAAGAGACTACTC TTCCAAAAAATGAAACAAGAGAAAAATCCATTTAAAGGATTGTCAACTGATAGAAAAAT GG

>SWRV4 (número de acesso KC117143)

CAGCAAAAGTAGATAAAAAAGATCAGGATAAATTTTACAACTCTATTATATATGGAATTG CGCCGCCACCACAGTTTAAAAAACGTTATAATACTAGTGACAATTCAAGAGGTATGAACT ATGAAACTACAATGTTTAATAAGGTGGCAGCTCTAGTTTGTGAAGCACTTAATTCAGTTA AGATTACCCAATCTGATCTTGCTAACGTTCTATCGAGAGTAGTTTCTGTTAGACATTTGGA AAACTTAGTGTTGAGAAAAGAGAATCATCAGGATGTACTTTTCCATTCGAAAGAACTACT ATTGAGATCTGTTTTAATAGCTATTGGTCAGATAAAAGAAATAGAAACAACTGCCACAGC TGAAGGAGGTGAGATAGTGTTTCAAAATGCTGCATTTACTATGTGGAAATTGACGTATTT AGATCACAAATTAATGCCTATTTTAGATCAGAATTTCATCGAGTATAAAATTACTGTAAA TGAAGATAAGCCAATTTCAGATGTGCATATTAAAGAACTTGTTTCTGAATTAAGATGGCA GTACAACAAATTTGCTGTAATAACACATGGTAAAGGTCACTATAGAGTTGTTAAATATTC ATCAGTTGCTAATCACGCTGATAGAGTATTTGCTACATTTAAAAATAACGCCAAGAGTGG TAATATTACTGAATTTAATCTTTTAGATCAAAGAATTATTTGGCAGAATTGGTATGCATTT ATGAAACAAGAGAAAAATCCATTTAAAGGACTGTCAACTGATAGAAAAATGG

>SWRV5 (número de acesso KC117144)

TATCCTCATTTAGAGAACGATAGCTATAAATTTATTCCTTTTAATAGTTTAGCTATAAAAT GTATGTTGACAGCAAAAGTAGATAAAAAAGATCAGGATAAATTTTACAACTCTATTATAT ATGGAATTGCGCCGCCACCACAGTTTAAAAAACGTTATAATACTAGTGACAATTCAAGAG GTATGAACTATGAAACTACAATGTTTAATAAGGTGGCAGCTCTAGTTTGTGAAGCACTTA ATTCAGTTAAGATTACCCAATCTGATCTTGCTAACGTTCTATCGAGAGTAGTTTCTGTTAG ACATTTGGAAAACTTAGTGTTGAGAAAAGAGAATCATCAGGATGTACTTTTCCATTCGAA AGAACTACTATTGAGATCTGTTTTAATAGCTATTGGTCAGATAAAAGAAATAGAAACAAC TGCCACAGCTGAAGGAGGTGAGATAGTGTTTCAAAATGCTGCATTTACTATGTGGAAATT GACGTATTTAGATCACAAATTAATGCCTATTTTAGATCAGAATTTCATCGAGTATAAAATT ACTGTAAATGAAGATAAGCCAATTTCAGATGTGCATATTAAAGAACTTGTTTCTGAATTA AGATGGCAGTACAACAAATTTGCTGTAATAACACATGGTAAAGGTCACTATAGAGTTGTT AAATATTCATCAGTTGCTAATCACGCTGATAGAGTATTTGCTACATTTAAAAATAACGCC AAGAGTGGTAATATTACTGAATTTAATCTTTTAGATCAAAGAATTATTTGGCAGAATTGG TTCCAAAAAATGAAACAAGAGAAAAATCCATTTAAAGGACTGTCAACTGATAGAAAAAT GG

>SWRV6 (número de acesso KC117145)

>SWRV7 (número de acesso KC117146)

ATCCTCATTTGGAGAACGATAGCTATAAATTTATTCCTTTCAATAATTTGGCAATAAAATG CATGTTGACAGCAAAAGTAGACAAAAAAGATCAAGATAAATTTATAATTCAATTGTTTA TGGAATTGCGCCACCTCCACAGTTTAAGAAACGTTATAATACTAATGATAATTCAAGAGG TATGAACTTTGAAACATCCATGTTCAACAAGGTGGCTATGTTAATTTGCGAAGCATTGAA TTCAATTAAGGTTACTCAATCTGATGTTGCAAACGTTCTTTCAAGAGTAGTTTCTGTTAGA GCCACTGCTGAAGGAGGAGAGAGATAGTATTCCAAAATACTGCTTTTACTATGTGGAAATTG ACATATCTAGAGCATAAACTAATGCCTATTTTGGATCAAAACTTCATTGAATACAAAATT ACTCTGAATGAAGATAAGCCAATTTCAGATATGTGTGTTAAAGAGCTTGTTGCTGAATTG AGATGGCAGTATAATAGATTTGCTGCAATAACACATGGTAAAGGTCACTATAGAGTTGTT AAAAGTGGTAATGTTACTGACTTTAATTTACTAGACCAGAGAATAATTTGGCAGAATTGG TATGCATTTACATCTTCTATGAAACAAGGTAATACTCTTGATGTATGCAAGAAACTACTCT TCCAAAAGATGAAACAAGAGAAAAATCCATTTAAAGGATTGTCAACTGATAGAAAAATG G

As sequências nucleotídicas completas do segmento 11 de rotavírus suínos geradas no presente estudo encontram-se relacionadas abaixo:

>SWRV1 (número de acesso KC117147)

>SWRV2 (número de acesso KC117148)

ACACAATCACGACCTTCAAGCAACGTTGGGTGCGATCAAGTGGATTTCTCCTTAACTAAA GGTGTTAACATTAGTGCTAACCTTGATTCATGTTTATCAATCTCAACTGACCATAAGAAGG AGAAATCCAAAAAAGACAAAAGTAGGAAACACTACCCAAGAATTGAAGCAGATTCCGAT TCTGAAGATTACGTTTTAGATGATTCAGATAGTGATGACGGTAAATGTAAGAATTGTAAA TACAAAAAGAAATATTTTGCATTAAGAATGAGGATGAAGCAAGTCGCAATGCAATTGAT CGAAGATTTGTAAGGTC

>SWRV3 (número de acesso KC117149)

>SWRV4 (número de acesso KC117150)

>SWRV5 (número de acesso KC117151)

>SWRV6 (número de acesso KC117152)

AGGTATTAATGTTAGTGCCAATCTTGATTCATGCGTATCAATTTCAACTGACCATAAGAA GGAGAAATCCAAGAAAGATAAAAGTAGGAAACACTACCCTAGAATTGAAGCAGATTCTG ACTCCGAAGATTACGTTTTAGATGATTCAGATAGTGATGACGGTAAATGTAAGAATTGTA AATATAAGAAAAAGTACTTTGCACTAAGAATGAGGATGAAGCAAGTCGCAATGCAATTG ATCGAAGATTTGTAATGTCAACCTGAGAGCACACTAGGGAGCTCCCCACTCCCGTTTTGT GACCA

>SWRV7

GGCTTTTAAAGCGCTACAGTGATGTCTCTCAGCATTGACGTAACGAGTCTTCCCTCAATTT CTTCTAGTATCTTTAAAAATGAATCGTCTTCTACAACGTCAACTCTTTCTGGAAAAATCTAT TGGTAGGAGTGAACAGTACATTTCACCAGATGCAG

APÊNDICE B

O alinhamento de um fragmento parcial de 926 nucleotídeos do gene codificador da NSP2 de rotavírus suínos, contemplando as amostras geradas neste estudo com as demais do Genbank representativas dos genotipos N da NSP2, segue abaixo:

| | 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 |
|---|---|
| | · · · · · I · |
| EF560709 Human Dhaka6 | A TEGECTERECTTECTTTTETTATCCTCATTTEGRAGAACGATAGCTATAAATTTATTCCTTTTAATAATTTAGCAATAAAATECATETTEGACAGCAA |
| GI[296412 Human PAH136 | |
| EF672615 Human ST3 | |
| JQ713649 Human K8 | |
| GV199489 Pig Gottfried | |
| EF990688 Pig A131 | |
| GV199195 pig RV172 FEDDOCOC pig A953 | ······································ |
| 611990696 Pig A233 G1199517 Pia VM | |
| D0494401 Bovine KJ44 | ę. T. |
| DQ494402 Bovine KJ75 | |
| GU827413 Cat BA222 | |
| KC117140 SWRV1 | |
| KC117141 SWRV2 | |
| KC117142 SWRV3 | |
| KC117143 SWRV4 KC117144 SWDV5 | |
| KC117145 SWRV6 | C F |
| KC117146 SWRV7 | С. 6. |
| | |
| | 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200 |
| | |
| EF560709 Human Dhaka6 | AAGTAGATAAAAAAGATCAAGATAAATTTTATAATTCTATTGTTTATGGGATTGCGCCACCACCACCACCACGATTTAGAAAACGTTATAATACTAGTGATAATTC |
| EF672587 Human LAL28 | |
| GU296412 Human PAA136 FF672615 Human ST3 | |
| 20713649 Human K8 | |
| GU199489 Pig Gottfried | G |
| EF990688 Pig A131 | |
| GV199195 pig RV172 | |
| EF990696 Pig A253 | |
| GU199517 Pig YM | |
| DU4944U1 Bovine KJ44 | |
| CU897413 Cat B8999 | |
| KC117140 SWRV1 | |
| KC117141 SWRV2 | |
| KC117142 SWRV3 | |
| KC117143 SWRV4 | |
| KC117144 SWRV5 | |
| KC117145 SWRV6 | |
| KC117146 SWRV7 | C |
| | |
| | 210 220 230 240 250 260 270 280 290 300 |
| EF560709 Human Dhaka6 | GAGAGGAATGAATTACGAAACAATTATGTTTAATAAGGTGGCTATCTTAATTGTGAAGCACTCAATTCGATTAAAGTTACACAATCTGAAGTTGCAAAT |
| EF672587 Human LAL28 | ATC.TG.TCCAAG.TCGGA.G.TCT |
| GU296412 Human PAH136 | |
| EF672615 Human ST3 | ATT |
| JU713649 Human K8 CU199489 Dig Cottfried | |
| EF990688 Pig A131 | |
| GU199195 pig RU172 | A |
| EF990696 Pig A253 | A,G,TT,TC |
| GU199517 Pig YM | ATT |
| DQ494401 Bovine KJ44 | ATTTTCTCT |
| DQ494402 Bovine KJ75 | ATTTTCTT |
| GU827413 Cat BA222 | A G T C T TCCA |
| KUII714U SWRV1 | A. G. T |
| KC117141 SWRVZ KC117149 SWDV3 | |
| KC117143 SWRV4 | A T C. T T.C |
| KC117144 SWRV5 | A T C. T T. CA |
| KC117145 SWRV6 | ATC.TTTCCCCGCT.GAGTC |
| KC117146 SWRV7 | ATC.TTTCCCCGCT.GAGTC |
| | |

continua

continua

| | | 310 | 320 | 330 | 340 | 350 | 360 | 370 | 380 | 390 | 400 |
|---|---|--|---|---|--|---|---|---|---|---|---|
| | | | 1 1 | 1 1 1 . | . | | | | | | - 1 |
| EF560709 | Human Dhaka6 | GTTCTTTCAAGAGT | AGTTTCCGTT | AGACATTTGGAA | AATCTAGTAT | TAAGGAAAG | AAATCATCAA | GATGTACTTT | ICCATTCGAA | AGAACTACTCTT | LA. |
| GII296412 | Human PAH136 | | T | | I.GG. | | . е с е | | | · · · · · · · · · · · · · · · · · · · | <i>.</i> |
| EF672615 | Human ST3 | | T | | | | | T.A. | т | T | |
| JQ713649 | Human K8 | | T | | G. | | | GG. | т | G | |
| GU199489 | Pig Gottfried | c | T | •••••• | T .G | A | . G G | • • • • • • • • • • • | .TA | | • • |
| EF990688 | Pig A131 | | T | CA | T .G | A | . G | | A | | r . |
| 60199195 FF000606 | pig RU172 Dig A253 | · · · · · · · · · · · · · · · · · · · | T T | ····· | Т.б т.с | .6 | e | | | GT.A | |
| GU199517 | Pig X255 Pig YM | | | | T.GG. | | . G G | | ТА. | | |
| DQ494401 | Bovine KJ44 | | T | | T.G | A | .G | | A | | |
| DQ494402 | Bovine KJ75 | | T | | T .G | A | .G | | A | | |
| GU827413 | Cat BA222 | AG | T | A | CTC | .GA | G. <mark>C</mark> G | c | .т | T.G. . | • • |
| KC117140 | SWRV1 | ······································ | · · · · · · T · · · | A | T.GGC | ••••• | .66 | ••••• | .TA | ••••• | • • |
| KC117141 | SWRV2 | ······································ | · · · · · · · T · · · · | A | T.GGC | | .6 | | .TA | | |
| KC117142 | SWRV4 | | т | | | | . G | | | A. 6 | г. Б. |
| KC117144 | SWRV 5 | AG | T | | | .GA | .G | | | A | 6. 6. |
| KC117145 | SWRV6 | | T | | T .GG | ••••• | . G G | | .тА | | |
| KC117146 | SWRV7 | | T | • | T .GGC | ••••• | . G G | • • • • • • • • • • • | .TA | | • • |
| | | | | | | | | | | | |
| | | 410 | 420 | 430 | 440 | 450 | 460 | 470 | 480 | 490 | 500 |
| EF560709 | Human Dhaka6 | AATCTGTGTTGATA | GCTATTGGTC | AGTCAAAAGAAA | TCGAAACTAC | TGCTACTGC | GAAGGAGGAG | AAATAGTATT | CAGAATGCA | GCTTTTACTATG' | r i r G |
| EF672587 | Human IAL28 | | | .AA | .т | CA | Г Т . | G | т | A | |
| GU296412 | Human PAH136 | | | .A | .т | | | | | | • • |
| EF672615 | Human ST3 | c | • • • • • • • • • • • | .A | .т | c | • • • • • • • • • • • • | | A | | •• |
| JQ713649 | Human K8 | ······ | ••••• | .A | . T | | G | .66 | сс | ••••• | •• |
| GU199489 | Pig Gottfried | GTA | ••••• | .A | .TC | ····C····· | | | CAT | | ••• |
| CII1990000 | rig Alsi nig PH179 | | | .A | т с | с а 1 | Г | с с | тт | | ••• |
| EF990696 | Pig A253 | GTA | | .A | .тс. | c | GG.AG. | | т | | |
| GU199517 | Pig YM | | | .A | .т | c | r | | т | | |
| DQ494401 | Bovine KJ44 | GTA | | .A | . T C | ¢ | r | | CAT | | •• |
| DQ494402 | Bovine KJ75 | GTA | ••••• | .A | .TC | c | ••••••••••••••••••••••••••••••••••••••• | · · · · · · · · · · · · · · · · · · · | | ••••••••••• | •• |
| GU827413 | Cat BA222 | .6T | ••••• | .AA | .TC | CA | 「GT. | ······································ | | AC | ••• |
| KC117140 | SWRV2 | | | .A | т. | C | r | . . | | | |
| KC117142 | SWRV3 | | | A | .TGC | CA | Г Т . | G | | | |
| KC117143 | SWRV4 | G | | AT | .AA. | CA | Г т . | .66 | | | ••• |
| KC117144 | SWRV 5 | GTA | ••••• | AT | .AA | CA | Г Т . | . G G | AT | A | •• |
| KC117145 | SWRV6 | GTA | ••••• | .A | .TC | c | ••••• | .6 | CAA.T | ••••• | •• |
| KC117140 | SWRV7 | | | | | | | | | | ••• |
| | | | | | | | | | | | |
| | | E10 | F20 | 520 | 540 | 550 | 560 | 520 | 500 | 590 | c n n |
| | | 510 | 520 | 530 . | 540 • • • • • • • • | 550 • • • • • • • • | 560 . | 570 • • • • • • • • • | 580 | 590 • • • • • • • • • • • | 600 • |
| EF560709 | Human Dhaka6 | 510 GAAATTGACGTATT | 520 TAGAT CATAA A | 530 . ATTAATGCCTAT | 540 . TTTGGATCAG | 550 . AATTTCATT(| 560 | 570 TACGTTGAAT | 580 . GAAGATAAAC | 590 CAATTTCAGATG' | 600 |
| EF560709 EF672587 | Human Dhaka6 Human IAL28 | 510 . GAAATTGACGTATT G | 520 TAGAT CATAA i | 530 | 540 TTTGGATCAG | 550 AATTTCATT | 560 - GAATATAAAAT | 570 TACGTTGAAT CTG.AC | 580 . GAAGATAAAC | 590 CAATTTCAGATG .G | 600 |
| EF560709 EF672587 GU296412 EF672615 | Human Dhaka6 Human IAL28 Human PAH136 Human ST3 | 510 | 520 . TAGAT CA TAA | 530 | 540 TTTGGATCAG | 550 | 560 . GAA TA TAAAA T | 570 TACGTTGAAT CTG.AC AC | 580 | 590 CAATTTCAGATG .G | 600 |
| EF560709 EF672587 GU296412 EF672615 JQ713649 | Human Dhaka6 Human IAL28 Human PAH136 Human ST3 Human K8 | 510 GAAATTGACGTATT G | 520 TAGAT CA TAAJ | 530 . ATTAATGCCTAT G | 540 TTTGGATCAG | 550 AATTTCATTI | 560 | 570 TACGTTGAAT CTG.AC AC AC | 580 | 590 CAATTTCAGATG | 600 |
| EF 560709 EF 672587 GU296412 EF 672615 JQ713649 GU199489 | Human Dhaka6 Human IAL28 Human PAH136 Human ST3 Human K8 Pig Gottfried | 510 GAAATTGACGTATT GG | 520 . TAGAT CATAAJ | 530 . ATTAATGCCTAT | 540 | 550 AATTTCATT(T. T. T. | 560 | 570 TACGTTGAAT CTG.AC AC AC A.A.C T | 580 | 590 CAATTTCAGATG | 600 |
| EF 560709 EF 672587 GU296412 EF 672615 JQ713649 GU199489 EF 990688 | Human Dhaka6 Human IAL28 Human PAH136 Human ST3 Human K8 Pig Gottfried Pig A131 | 510 GAAATTGACGTATT GA | 520 . TAGAT CATAAA C | 530 ATTAATGCCTAT | 540 | 550 AATTTCATT(T. T. T. T. | 560 | 570 TACGTTGAAT CTG.AC AC AC A.A.C T. | 580 | 590 CAATTTCAGATG .G | 600 I I G |
| EF 560709 EF 672587 GU296412 EF 672615 JQ713649 GU199489 EF 990688 GU199195 | Human Dhaka6 Human IAL28 Human PAH136 Human ST3 Human K8 Pig Gottfried Pig A131 pig RU172 | 510 GAAATTGACGTATT G | 520 TAGAT CATAAA C | 530 ATTAATGCCTAT | 540 TTTGGATCAG C .AAAAAAA | 550 AATTTCATT T. T. T. | 560 J J J J J J J J | 570 TACGTTGAAT CTG.AC .AC .AAC .T .T .TG.AC | 580 GAAGATAAAC | 590 CAATTTCAGATG .G | 600 I I G |
| EF560709 EF672587 GV296412 EF672615 JQ713649 GV199489 EF990688 GV199195 EF990696 EF990696 | Human Dhaka6 Human IAL28 Human PAH136 Human ST3 Human K8 Pig Gottfried Pig A131 Pig R1172 Pig A253 | 510 GAAATTGACGTATT GA A AC. AC. AC. AC. AC. AC. AC. AC. | 520 TAGAT CATAAI C C G C | 530 ATTAATGCCTAT . | 540 TTTGGATCAG A | 550 AATTTCATTC T | 560 G G C C C | 570 TACGTTGAAT C. TG.A. C A C A C A C T. TG.A. C TG.A. C TG.A. C TG.A. C | 580 GAAGATAAAC | 590 CAATTCAGATG G | 600 IA G |
| EF560709 EF672587 GV296412 EF672615 JQ713649 GV199489 EF990688 GV199195 EF990696 GV199517 D0494401 | Human Dhaka6 Human IAL28 Human PAH136 Human K3 Pig Gottfried Pig A131 Pig A131 Pig A253 Pig YM Bovine KJ44 | 510 GAAATTGACGTATT GA AC AC AC AC AC AC AC C.T.AC C.AC | 520 TAGAT CATAAA CC. CC. CC. | 530 ATTAATGCCTAT | 540 | 550 AATTTCATTI T. T. T. T. T. T. | 560 SAATATAAAAA | 570 TACGTTGAATC C. TG.A. C AC AC T T TG.A. C T TG.A. C T T TG.A. C | 580 | 590 CAATTTCAGATG G. C. .C. .C. .A. .C. .G. | 600 HA G |
| EF 560709 EF 672587 GU296412 EF 672615 JQ713649 EF 990688 GU199195 EF 990696 GU199517 DQ494401 DQ494402 | Human Dhaka6 Human IAL28 Human PAH136 Human K8 Pig Gottfried Pig A131 Pig R172 Pig A253 Pig YM Bovine KJ44 Bovine KJ75 | 510 GAAATTGACGTATT G A A AC AC AC AC AC AC C.AAC | 520 TAGATCATAAI C. C. C. C. G | 530 ATTAATGCCTAT G. G. .C.G. .C.G. .C. .C. | 540 TTTGGATCAG A A C C.A. | 550 | 560 | 570 TACGTTGAATT C. TG.A. C A. C AC T TG.A. C T TG.A. C T TG.A. C T TG.A. C T TG.A. C T TG.A. C T TG.A. C T TG.A. C T TG T TG T | 580 | 590 | 600 I IA |
| EF560709 EF672587 GU296412 EF672615 JQ713649 GU199489 EF990688 GU199195 EF990696 GU199517 DQ494401 DQ494402 GU827413 | Human Dhaka6 Human IAL28 Human PAH136 Human K8 Pig Gottfried Pig A131 pig RU172 Pig A253 Pig YM Bovine KJ74 Bovine KJ75 Cat BA222 | 510 GAAATTGACGTATT GA A | 520 TAGAT CATAB C C G C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C | 530 ATTAATGCCTAT G . G . | 540 | 550 | 560 GAA TA TABABA T | 570 TACGTTGAAT C. TG.A. C . A. A. C . A. A. C . T . TG.A. C | 580 | 590 | 600 I IA |
| EF560709 EF672587 GU296412 EF672615 JQ713649 GU199489 EF990688 GU199195 EF990696 GU199517 DQ494401 DQ494401 DQ494401 XC117140 | Human Dhaka6 Human IAL28 Human PAH136 Human ST3 Human K8 Pig Gottfried Pig A131 pig RU172 Pig A253 Pig YM Bovine KJ44 Bovine KJ75 Cat BA222 SWRV1 | 510 GAAATTGACCTATT GA A A A A A A A C.T.AC C.AAC C.AAC G.G.C.AAC | 520 TAGAT CATAAI CC | 530 IIII ATTAATGCCTAT G. | 540 | 550 AATTTCATT(| 560 | 570 TACGTTGAAT C. TG.A. C A. C A. A. C T. T. TG.A. C T. TC. TG.A. C T. TG.A. C T. TG.A. C T. TG.A. C | 580 | 590 | 600 IA .G |
| EF560709 EF672587 GU296412 EF672615 JQ13649 GU199489 EF990688 GU199195 EF990696 GU199517 DQ494401 DQ494402 GU827413 KC117140 KC117141 | Human Dhaka6 Human IAL28 Human PAH136 Human ST3 Human K8 Pig Gottfried Pig A131 pig RU172 Pig A253 Pig YM Bovine KJ74 Bovine KJ74 Bovine KJ75 Cat BA222 SWRV1 SWRV2 | 510 GAAATTGACGTATT GT. C A C.T.A.C C.T.A.C C.T.A.C C.A.A.C C.A.A.C C.A.A.C C.A.A.C C.A.A.C C.A.A.C | 520 TAGAT CATAAN C C C C C C C C C C C C C C C | 530 ATTAATGCCTAT G G C G C C C C C C C C | 540 | 550 | 560 | 570 | 580 J.J.J.J.J. SAAGATAAAC C.G. C.G. C.G. | 590 CAATTTCAGATG .C | 600 1 TA . G |
| EF 560709 EF 672587 GU296412 EF 672615 JQ713649 GU199489 EF 990686 GU199195 EF 990696 GU199195 FF 990696 GU199195 QU494401 DQ494402 GU827413 KC117140 KC117141 | Human Dhaka6 Human IAL28 Human PAH136 Human ST3 Human K8 Pig Gottfried Pig A131 pig RU172 Pig A253 Pig YM Bovine KJ74 Bovine KJ75 Cat Ba222 SWRV1 SWRV2 SWRV2 SWRV3 | 510 GAAATTGACGTATT G. A. A. A. C.T.A.C C.A.A.C C.A.A.C C.A.A.C C.A.A.C C.A.A.C | 520 TAGAT CATAAN C | 530 ATTAATGCCTAT | 540 | 550 | 560 | 570 | 580 | 590 CAATTTCAGATG .CA .CA .CA .CA .CA .CA .CA .A .A | 600 IA .G |
| EF 560709 EF 672587 GU296412 EF 672615 JQ713649 GU199988 EF 990686 GU1999517 DQ494401 DQ494402 GU827413 KC117141 KC117141 KC117142 | Human Dhaka6 Human IAL28 Human PAH136 Human ST3 Human K8 Pig Gottfried Pig A131 pig RU172 Pig A253 Pig YM Bovine KJ75 Cat BA222 SWRV1 SWRV3 SWRV3 SWRV4 | 510 GAAATTGACGTATT GA AC AC AC AC AC AC AC AC C.T.AC C.A.A.C C.A.A.C C.A.A.C C.A.A.C C.A.A.C | 520 TAGAT CATAAA CC. GC. GC. CC. CC. CC. CC. | 530 ATTAATGCCTAT . | 540 | 550 | 560 | 570 TACGTGAAT C. TG.A. C A C A C | 580 | 590 CAATTTCAGATG' .C | 600 IA .G |
| EF 560709 EF 672587 GU296412 EF 672615 GU199489 EF 990686 GU199195 EF 990696 GU199195 EF 990696 GU19917 DQ494401 DQ494402 GU19917 XC117140 XC117141 XC117143 XC117144 | Human Dhaka6 Human IAL28 Human PAH136 Human K3 Pig Gottfried Pig Gottfried Pig A131 Pig A253 Pig YM Bovine KJ44 Bovine KJ75 Cat BA222 SWRV1 SWRV2 SWRV3 SWRV4 SWRV5 SWRV6 | 510 GAAATTGACGTATT GT.C AC A.C A.C A.C A.C C.T.A.C C.A.A.C C.A.A.C C.A.A.C C.A.A.C C.A.A.C C.A.A.C | 520 TAGATCATAAI C. C. C. G. C. C. C. C. C. C. C. C. C. C. C. C. C. C. C. C. C. | 530 ATTAATGCCTAT GG CGG CGG CG C | 540 | 550 | 560 | 570 TACGTTGAAT C. TG.A. C A. A. C A. A. C TG.A. C T. TG.A. C TG.A. C TG.A. C TC. C TG.A. TC. TG.A. TG.A. TG.A. TG.A. TG.A. | 580 | 590 CATTTCAGATG G. C. C. C. C. C. C. C. C. C. C | 600 I I A G C C C C C C C C C C C C C C C C C C |
| EF 560709 EF 672587 GU296412 EF 672615 GU199489 EF 990688 GU199195 EF 990688 GU199195 EF 990696 GU199177 DQ494401 DQ494402 GU199177 DQ494401 GU197142 KC117145 KC117145 KC117144 | Human Dhaka6 Human IAL28 Human PAH136 Human ST3 Human K8 Pig Gottfried Pig A131 pig RU172 Pig X253 Pig XM Bovine KJ44 Bovine KJ44 Bovine KJ45 Gotine KJ75 Cat BA222 SWRV1 SWRV2 SWRV3 SWRV4 SWRV4 SWRV5 SWRV5 | 510 GAAA TTGA CTAATT G. A. A. A. C.T.A.C C.T.A.C C.A.A.C C.A.A.C C.A.A.C C.A.A.C C.A.A.C C.A.A.C C.A.A.C C.A.A.C C.A.A.C C.A.A.C | 520 TAGAT CATAAA C. C. C. C. C. C. C. C. C. C. | 530 ATTAATGCCTAT GG | 540 | 550 | 560 GAA TA TA BAA A T | 570 TACGTTGAAT C. TG.A. C A. A. C A. A. C TG.A. C T. TG.A. C T. TG.A. C TC. C TG.A. TG.A. TG.A. TG.A. TG.A. TG.A. TG.A. | 580 | 590 | |
| EF560709 EF672587 GU296412 EF672615 JQ713649 GU199195 EF990688 GU199195 EF990688 GU199197 DQ494401 DQ494402 GU199177 DQ494402 GU297413 KC117141 KC117142 KC117144 | Human Dhaka6 Human IAL28 Human PAH136 Human ST3 Human K8 Pig Gottfried Pig A131 pig RU172 Pig A253 Pig YM Bovine KJ74 Bovine KJ74 Bovine KJ74 Bovine KJ74 Bovine KJ75 Cat BA222 SWRV1 SWRV2 SWRV3 SWRV3 SWRV5 SWRV5 SWRV6 SWRV7 | 510 GAAATTGACCTATT G. A. A. A. C.T.A. C.T.A. C.A.A. C.A.A. C.A.A. C.A.A. C.A.A. C.A.A. C.A.A. C.A.A. C.A.A. C.A.A. C.A.A. C.A.A. C.A.A. C.A.A. C.A.A. C.A.A. C.A.A. C.A.A. C. C.A. C. C.A. C. C.A. C. C.A. C. C.A. C. C.A. C. C.A. C. C.A. C. C.A. C. C.A. C. C.A. C. C.A. C. C.A. C. C.A. C. C.A. C. C.A. C. C.A. C. C.A. C. C.A. C. C. A. C. C. A. C. C. A. C. A. C. A. C. A. C. A. C. A. C. A. C. A. A. C. | 520 TAGAT CATAAA CC | 530 ATTAATGCCTAT G G C G C C C C C C C C | 540 | 550 | 560 | 570 | 580 | 590 CAATTTCAGATG .C | 600 IA |
| EF 560709 EF 672587 GU296412 EF 672615 JQ713649 GU199489 EF 990688 GU199195 EF 990688 GU199195 EF 990686 GU199195 GU827413 KC117140 KC117141 KC117142 KC117144 KC117145 KC117146 | Human Dhaka6 Human IAL28 Human PAH136 Human ST3 Human K8 Pig Gottfried Pig A131 pig RU172 Pig A253 Pig YM Bovine KJ74 Bovine KJ74 Bovine KJ75 Cat BA222 SWRV1 SWRV2 SWRV3 SWRV4 SWRV5 SWRV6 SWRV7 | 510 GAAATTGACGTATT G. A. A. C.T.A. C.T.A. C.T.A. C.A.A. C. A. C.A.A. C. C.A.A. C. A. C. A. C. C.A.A. C. A. C. A. C. A. C. A. C. A. C. A. C. A. C. A. C. A. C. A. C. A. C. A. C. A. C. A. C. A. C. A. A. | 520 TAGAT CATAAA CCC. CC. | 530 ATTAATGCCTAT | 540 | 550 | 560 | 570 | 580 | 590 CAATTT CAGATG .C | 600 TA G G G G G G G G G G G G G G G G G G |
| EF 560709 EF 672587 GU296412 EF 672615 JQ713649 GU199489 EF 990686 GU199157 DQ494401 DQ494402 GU827413 KC117140 KC117141 KC117142 KC117144 KC117145 KC117146 EF 560709 | Human Dhaka6 Human IAL28 Human PAH136 Human ST3 Human K8 Pig Gottfried Pig A131 pig RU172 Pig A253 Pig YM Bovine KJ75 Cat Ba222 SWRV1 SWRV2 SWRV3 SWRV4 SWRV3 SWRV4 SWRV5 SWRV5 SWRV6 SWRV7 | 510 GAAATTGACGTATT GA A AC. AC. C.T.A.C. C.A.A.C. C.C.A.A.C. C.A.A.C. C.A.A.C. C.C.A.A.C. C.C.A.A.C. C.C.A.A.C. C.C.A.A.C. C.C.A.A.C. C.C.A.A.C. C.C.A.A.C. C.C.A.A.C. C.C.A.A.C. C.C.A.A.C. C.C.A.A.C. C.C.C.A.A.C. | 520 TAGAT CA TAAN CC C | 530 ATTAATGCCTAT | 540 | 550 | 560 | 570 TACGTTGAATI C. TG.A. C A C A C | 580 | 590 CATTTCAGATG .C | 600 TA G C C C C C C C C C C C C C |
| EF 560709 EF 672587 GU296412 EF 672615 GU199489 EF 990686 GU199195 EF 990696 GU199175 DQ494401 DQ494402 GU19917 DQ494401 C0127140 KC117141 KC117144 KC117144 KC117146 EF 560709 EF 672587 | Human Dhaka6 Human IAL28 Human ST3 Human ST3 Human K8 Pig Gottfried Pig A131 pig RU172 Pig A253 Pig YM Bovine KJ44 Bovine KJ44 Bovine KJ44 Bovine KJ44 Bovine KJ75 Cat BA222 SWRV1 SWRV3 SWRV4 SWRV5 SWRV5 SWRV5 SWRV5 SWRV5 SWRV7 | 510 GAAA TTGA CTAATT G. A. A. C.T.A. C C.T.A. C C.T.A. C C.A. A. C C.A. C C.C.A. C C.A. C C.C.A. C C.C.C.C.C C.C.C.C.C.C C.C.C.C | 520 TAGAT CATAAA TAGAT CATAAA C | 530 IIII. ATTAATGCCTAT G. | 540 | 550 | 560 | 570 | 580 | 590 CATTTCAGATG' G. C. C. C. A. C. A. C. A. C. A. A. C. A. C. A. A. C. A. C. A. C. A. A. A. A. A. A. A. A. A. A | 600 1 TA 6 |
| EF 560709 EF 672587 GU296412 EF 672615 GU199489 EF 990688 GU199195 EF 990688 GU199197 DQ494401 DQ494401 DQ494402 GU19917 DQ494402 GU294113 KC117140 KC117144 KC117145 KC117146 EF 560709 EF 560708 | Human Dhaka6 Human IAL28 Human ST3 Human K8 Pig Gottfried Pig A131 pig RU172 Pig A253 Pig YM Bovine KJ44 Bovine KJ75 Cat BA222 SWRV1 SWRV2 SWRV3 SWRV4 SWRV5 SWRV4 SWRV5 SWRV4 SWRV5 SWRV5 SWRV7 | 510 GAAATTGACCTAATT G. A. A. A. A. A. A. A. A. C.T. A. C.A. A. C. A. C.A. A. C. A. C.A. A. C. A. C.A. A. C. A. C.A. A. C. A. C.A. A. C. | 520 TAGATCATAAI C | 530 ATTAATGCCTAT G. G. C. G. C. C. C. C. C. C. | 540 | 550 | 560 | 570 | 580 | 590 | |
| EF 560709 EF 672587 GU296412 EF 672615 JQ713649 GU199195 EF 990688 GU199195 EF 990688 GU199197 DQ494401 DQ494401 DQ494402 GU297413 KC117140 KC117143 KC117144 KC117145 KC117146 EF 560709 EF 672587 GU296412 EF 672557 | Human Dhaka6 Human IAL28 Human S3 Human K8 Pig Gottfried Pig A131 pig RU172 Pig A23 Pig YM Bovine KJ44 Bovine KJ44 Bovine KJ44 Bovine KJ45 SWRV4 SWRV3 SWRV4 SWRV3 SWRV4 SWRV5 SWRV6 SWRV5 SWRV6 SWRV5 SWRV6 SWRV7 | 510 GAAATTGACCTAATT G. A. A. A. A. C.T.A. C.T.A. C.A.A. C. A. C.A.A. C. A. C.A.A. C. A. C.A.A. C. A. C.A.A. C. A. C.A.A. C. C. A. C. C. A. C. C. A. C. C. A. C. C. C. | 520 TAGATCATAAI C | 530 attaatGCCTAT G G G C G C C | 540 | 550 | 560 | 570 | 580 | 590 CAATTTCAGATG .C | |
| EF 560709 EF 672587 GU296412 EF 672615 JQ713649 GU199195 EF 990688 GU199195 EF 990688 GU199197 DQ494401 DQ494402 GU392717 DQ494402 GU327413 KC117141 KC117145 KC117146 EF 560709 EF 672587 GU296412 EF 5672615 JQ713649 | Human Dhaka6 Human IAL28 Human PAH136 Human ST3 Human K8 Pig Gottfried Pig A131 Pig RU172 Pig A253 Pig YM Bovine KJ74 Bovine KJ74 Human Dhaka6 Human IAL28 Human K3 Human K3 Human K3 | 510 GAAATTGACGTATT G. A. A. A. C.T.A. C.T.A. C.T.A. C.A.A. C.A.A. C.A.A. C.A.A. C.A.A. C.A.A. C.A.A. C.A.A. C.A.A. C.A.A. C.A.A. C.A.A. C.A.A. C.A.A. C.A.A. C.A. A. C.A. C.A. C.A. C.A. C.A. C.A. C. A. C. C.A. C. A. C. C.A. C. C.A. C. C.A. C. C.A. C. C.A. C. C.A. C. C.A. C. C.A. C. C.A. C. C.A. C. | 520 TAGAT CATAAA CC | 530 ATTAATGCCTAT | 540 | 550 | 560 | 570 | 580 | 590 CATTTCAGATG CA .C | 600 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 |
| EF 560709 EF 672587 GU296412 EF 672615 JQ713649 GU199195 EF 990686 GU199195 EF 990686 GU199195 CH 990686 GU199195 GU394402 GU827413 KC117140 KC117140 KC117141 KC117145 KC117146 EF 560709 EF 672587 GU296412 EF 672615 JQ713649 GU199489 EF 990688 | Human Dhaka6 Human IAL28 Human PAH136 Human S3 Human K8 Pig Gottfried Pig A131 pig RU172 Pig A253 Pig YM Bovine KJ75 Cat BA222 SWRV1 SWRV2 SWRV2 SWRV3 SWRV4 SWRV5 SWRV5 SWRV5 SWRV6 SWRV5 SWRV6 SWRV7 SWRV7 SWRV7 SWRV3 SWRV7 SWRV3 SWRV5 SWRV6 SWRV7 | 510 GAAATTGACGTATT G. A. A. A. C.T.A. C.T.A. C.C.T.A. C.C.A.A. C.C.A.A. C.C.A.A. G.C.A.A. C.C.A.A. C.C.A.A. C.C.A.A. C.C.A.A. C.C.A.A. C.C.A.A. C.C.A.A. C.C.A.A. C.C.A.A. C.C.A.A. C.C.A.A. C.C.A.A. C.C.A. G.C.C.A. A.C. C.A.A. C.C. C.C.A. C.C.A. C.C. C.C.A. C.C. C. | 520 TAGAT CATAAA CC CC CC CC | 530 ATTAATGCCTAT G. G. G. C. G. C. G. C. C. C. C. C. C. C. C. C. G. G. C. C. C. C. C. G. C. | 540 | 550 | 560 | 570 | 580 | 590 CATTTCAGATG CA .A .A .A .A .A .A .A .A .A | 600 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 |
| EF 560709 EF 672587 GU296412 EF 672615 GU199489 EF 990688 GU199195 EF 990688 GU199195 EF 990686 GU19917 DQ494402 GU39417 QU394401 DQ494402 GU394401 CU17144 KC117144 KC117145 KC117146 EF 560709 EF 672587 GU296412 EF 672615 JQ713649 GU199489 EF 990688 GU19915 | Human Dhaka6 Human IAL28 Human ST3 Human K8 Pig Gottfried Pig A131 pig RU172 Pig A253 Pig YM Bovine KJ44 Bovine KJ44 Bovine KJ44 Bovine KJ44 Bovine KJ44 Bovine KJ44 Bovine KJ45 SWRV3 SWRV4 SWRV3 SWRV4 SWRV5 SWRV5 SWRV5 SWRV5 SWRV5 SWRV5 SWRV5 SWRV5 SWRV7 SWRV4 SWRV5 SWRV7 SWRV5 SWRV6 SWRV7 SWRV5 SWRV6 SWRV7 SWRV6 SWRV7 SWRV6 SWRV7 SWRV6 SWRV7 SWRV6 SWRV7 SWRV6 SWRV7 SWRV6 SWRV7 SWRV6 SWRV7 SWRV6 SWRV7 SWRV6 SWRV7 SWRV6 SWRV7 SWRV6 SWRV7 SWRV6 SWRV7 SWRV6 SWRV7 SWRV6 SWRV7 SWRV6 SWRV7 SWRV6 SWRV7 SWRV6 SWRV7 SWRV7 SWRV7 SWRV7 SWRV6 SWRV7 SWR | 510 GAAA TTGA CTAATT G. A. A. C.T.A.C C.T.A.C C.T.A.C C.A.A.C C.A.A.C C.A.A.C C.A.A.C C.A.A.C C.A.A.C C.A.A.C C.A.A.C C.A.A.C C.A.A.C C.A.A.C C.A.A.C C.A.A.C C.C.A.C C.C.A.C C.C.C.C.C C.C.C.C G.C.C.C.C G.C.C.C.C G.C.C.C.C G.C.C.C.C G.C.C.C.C G.C.C.C.C G.C.C.C.C G.C.C.C.C.C G.C.C.C.C.C G.C.C.C.C.C G.C.C.C.C.C G.C.C.C.C.C G.C.C.C.C.C G.C.C.C.C.C.C G.C.C.C.C.C.C G.C.C.C.C.C.C G.C.A.C.C.C.C.C G.C.C.C.C.C.C.C G.C.A.C.C.C.C.C.C G.C.C.C.C.C.C.C.C.C G.C.C.C.C.C.C.C.C.C.C.C.C.C.C.C.C.C. | 520 TAGAT CATAAA CC CC CC CC CC CC GC GC GC GC GC TC TC TC TC | 530 | 540 | 550 | 560 | 570 TACGTGAAT TACGTGAAT C. TG.A.C A. A. C T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. T. | 580 | 590 CATTTCAGATG' G. C. C. C. A. C. A. C. A. C. A. A. C. A. A. A. A. A. A. A. A. A. A | 600 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 |
| EF 560709 EF 672587 GU296412 EF 672615 JQ713649 GU199489 EF 990688 GU199195 EF 990688 GU199177 DQ494401 DQ494401 DQ494402 GU29413 KC117140 KC117142 KC117144 KC117145 KC117146 EF 560709 EF 506709 EF 502587 GU296412 EF 672587 GU296412 EF 672587 GU296412 FU39688 GU3947 FU39688 GU3947 FU39688 GU3947 FU39688 GU3947 FU39688 GU3947 FU39688 GU3947 FU39688 GU3947 FU39688 GU3947 FU39688 GU3947 FU39688 GU3947 FU39688 GU3947 FU39688 GU3947 FU39688 GU397 FU39688 GU397 FU39688 FU3 | Human Dhaka6 Human IAL28 Human ST3 Human K8 Pig Gottfried Pig A131 pig RU172 Pig A253 Bovine KJ44 Bovine KJ44 Bovine KJ44 Bovine KJ44 Bovine KJ44 Bovine KJ45 SWRV3 SWRV4 SWRV4 SWRV5 SWRV4 SWRV5 SWRV5 SWRV4 SWRV5 SWRV5 SWRV4 SWRV5 SWRV6 SWRV6 SWRV7 Human Dhaka6 Human IAL28 Human FA1136 Human K8 Pig Gottfried Pig A131 pig RU172 Pig A253 | 510 GAAATTGACCTATT | 520 TAGATCATAAI C | 530 IIII. ATTAATGCCTAT G. A. G. A. A. G. A. | 540 | 550 | 560 | 570 | 580 J. J. J | 590 CAATTCAGATG . G | 600 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 |
| EF 560709 EF 672587 GU296412 EF 672615 JQ713649 GU199489 EF 990688 GU199195 EF 990688 GU199177 DQ494401 DQ494401 DQ494402 GU29413 KC117140 KC117141 KC117145 KC117144 KC117145 KC117146 EF 560709 EF 672567 GU296412 EF 6725615 JQ713649 GU199419 EF 990688 GU199195 EF 990688 GU199195 | Human Dhaka6 Human IAL28 Human ST3 Human K8 Pig Gottfried Pig A131 pig RU172 Pig A253 Pig YM Bovine KJ44 Bovine KJ44 Bovine KJ44 Bovine KJ44 Bovine KJ44 Bovine KJ45 SWRV4 SWRV3 SWRV4 SWRV3 SWRV4 SWRV5 SWRV5 SWRV5 SWRV6 SWRV5 SWRV6 SWRV5 SWRV6 SWRV7 SWRV7 SWR | 510 GAAATTGACCTATT G. A. A. A. A. A. A. C.T.A. C.T.A. C.A.A. C.A. A. C.A. C.A. C.A. C.A. C. C.A. C. C. <th>520 TAGATCATAAI C T</th> <th>530 ATTAATGCCTAT </th> <th>540 </th> <th>550 </th> <th>560 </th> <th>570 </th> <th>580 </th> <th>590 CAATTTCAGATG . G . G . C . C . C . C . C . C . A . C . A . C . A . C . A . C . A . C . A . A . A . A . A . A . A . A</th> <th>600 1 TA 6</th> | 520 TAGATCATAAI C T | 530 ATTAATGCCTAT | 540 | 550 | 560 | 570 | 580 | 590 CAATTTCAGATG . G . G . C . C . C . C . C . C . A . C . A . C . A . C . A . C . A . C . A . A . A . A . A . A . A . A | 600 1 TA 6 |
| EF 560709 EF 672587 GU296412 EF 672615 JQ713649 GU199489 EF 990688 GU199195 EF 990688 GU199195 CH 990688 GU199197 DQ494401 CH 944402 KC117140 KC117144 KC117145 KC117146 EF 560709 EF 672587 GU296412 EF 572615 JQ713649 GU199489 EF 990688 GU199195 EF 990688 GU199195 | Human Dhaka6 Human IAL28 Human PAH136 Human ST3 Human K8 Pig Gottfried Pig A131 pig RU172 Pig A253 Pig YM Bovine KJ74 Bovine KJ74 Bovine KJ75 Cat BA222 SWRV4 SWRV2 SWRV3 SWRV4 SWRV5 SWRV5 SWRV6 SWRV5 SWRV6 SWRV7 SWRV6 SWRV7 SWRV6 SWRV7 SWRV6 SWRV7 SWRV6 SWRV7 SWRV6 SWRV7 SWRV6 SWRV7 SWRV6 SWRV7 SWRV6 SWRV7 SWRV7 SWRV6 SWRV7 SWRV | 510 GAAATTGACCTATT G. A. A. A. C.T.A. C.T.A. C.T.A. C.A.A. C.A.A. C.A.A. C.A.A. C.A.A. C.A.A. C.A.A. C.A.A. C.A.A. C.A.A. C.A.A. C.A.A. C.A.A. C.A.A. C.A.A. C.A. A. C.A. C.A. C.A. C.A. C.A. C.A. C.A. C.A. C. A. C. C.A. C. C.A. C. C.A. C. C.A. C. C.A. C. C.A. C. C.A. C. | 520 TAGAT CATAAA CC | 530 ATTAATGCCTAT | 540 | 550 | 560 | 570 | 580 | 590 CATTTCAGATG .C | 600 1 TA 6 |
| EF 560709 EF 672587 GU296412 EF 672615 JQ713649 GU199489 EF 990686 GU199195 EF 990696 GU199177 DQ494401 DQ494402 GU27413 KC117140 KC117144 KC117144 KC117145 KC117146 EF 560709 EF 672587 GU296412 EF 672615 JQ713649 GU199489 EF 990686 GU19919517 DQ494401 DQ494402 | Human Dhaka6 Human IAL28 Human FAH136 Human ST3 Human K8 Pig Gottfried Pig A131 pig RU172 Pig A253 Pig YM Bovine KJ74 Bovine KJ74 Bovine KJ75 Cat BA222 SWRV1 SWRV2 SWRV2 SWRV3 SWRV4 SWRV5 SWRV5 SWRV5 SWRV6 SWRV5 SWRV6 SWRV7 SWRV7 SWRV7 SWRV7 SWRV7 SWRV7 SWRV7 SWRV6 SWRV7 SWRV6 SWRV7 SWRV | 510 GAAATTGACGTATT G. A. A. A. A. C.T.A. C.T.A. C.T.A. C.A. C.A.A. C.A.A. C.A.A. C.A.A. A. C.A.A. C.A. C.A. C.A. C. C.A. C.A. C. C.A. C. C.A. C. C.A. C. C. A. < | 520 TAGAT CATAAA CCC CC CC CC CC C | 530 ATTAATGCCTAT | 540 | 550 | 560 | 570 | 580 | 590 CATTTCAGATG C | 600 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 |
| EF 560709 EF 672587 GU296412 EF 672615 GU199489 EF 990688 GU199195 EF 990688 GU199195 CH 990688 GU199177 DQ494402 GU827413 KC117140 KC117144 KC117145 KC117146 EF 560709 EF 672587 GU296412 EF 672587 GU296412 EF 672587 GU296412 EF 672587 GU296412 EF 672587 GU296412 EF 672587 GU296412 EF 672615 JQ713649 GU199157 DQ494402 GU39157 DQ494402 GU894132 | Human Dhaka6 Human IAL28 Human ST3 Human K8 Pig Gottfried Pig A131 pig RU172 Pig A253 Pig YM Bovine KJ44 Bovine KJ44 Bovine K34 SWRV4 SWRV4 SWRV5 SWRV5 SWRV5 SWRV5 SWRV5 SWRV5 SWRV7 Human IAL28 Human IAL28 Human ST3 Human K8 Pig Gottfried Pig Gottfried Pig A131 pig RU172 Pig A253 Pig YM Bovine KJ44 Bovine KJ75 Cat BA222 | 510 GAAA TTGA CTAATT G. A. A. C.T.A.C C.T.A.C C.T.A.C C.A.C.C C.A.C.C C.C.C.C.C G.C.A.C.C C.C.C.C.C C.C.C.C C.C.C.C | 520 TAGATCATAAI C | 530 ATTAATGCCTAT ATAATGCCTAT G. G. G. C. G. C. G. C. G. C. G. C. G. G. G. G. G. G. C. G. C. G. < | 540 | 550 | 560 | 570 | 580 | 590 CATTTCAGATG' G. C. C. C. C. A. C. A. C. A. C. A. A. C. A. A. A. C. A. A. A. A. A. A. A. A. A. A | 600 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 |
| EF 560709 EF 672587 GU296412 EF 672615 JQ713649 GU199489 EF 990688 GU199195 EF 990688 GU199177 DQ494401 DQ494401 DQ494402 GU827413 KC117144 KC117145 KC117144 KC117145 KC117146 EF 560709 EF 502587 GU296412 EF 672587 GU296412 EF 672587 GU199489 EF 990688 GU199195 EF 990688 GU199195 EF 990688 GU1991517 DQ494401 DQ494402 GU827413 KC117140 | Human Dhaka6 Human IAL28 Human ST3 Human ST3 Human K8 Pig Gottfried Pig A131 pig RU172 Pig A253 Pig YM Bovine KJ44 Bovine KJ75 Cat BA222 SWRV1 SWRV2 SWRV3 SWRV4 SWRV5 SWRV6 SWRV5 SWRV6 SWRV6 SWRV6 SWRV6 SWRV7 Human Dhaka6 Human IAL28 Human FAH136 Human ST3 Human K8 Pig Gottfried Pig A131 pig RU172 Pig A253 Pig YM Bovine KJ44 Bovine KJ75 Cat BA222 SWRV1 | 510 GAAATTGACCTATT G. A. A. A. A. A. C.T.A. C.T.A. C.T.A. C.A.A. C.A.A. C.A.A. C.A.A. C.A.A. C.A.A. C.A.A. C.A.A. A. C.A.A. A. C.A.A. C.A.A. C.A.A. A. C.A. A. C.A. A. C. A. C. C. C. C. C. | 520 TAGATCATAAI TAGATCATAAI C. C. C. | 530 | 540 | 550 | 560 | 570 | 580 | 590 CAATTTCAGATG . G | |
| EF 560709 EF 672587 GU296412 EF 672615 JQ713649 GU199489 EF 990688 GU199195 EF 990688 GU199197 DQ494401 DQ494402 GU29413 KC117140 KC117143 KC117144 KC117145 KC117144 KC117145 EF 560709 EF 672587 JQ713649 GU19949 EF 990688 GU199195 EF 990688 GU199195 EF 990688 GU199195 EF 990688 GU199195 FF 990688 GU199195 FF 990688 GU199195 FF 990584 GU199177 DQ494402 GU29113 KC117140 KC117140 | Human Dhaka6 Human IAL28 Human YAH136 Human ST3 Human K8 Pig Gottfried Dig A131 pig RU172 Pig A253 Pig YM Bovine KJ75 Cat BA222 SWRV4 SWRV2 SWRV2 SWRV5 SWRV6 SWRV5 SWRV6 SWRV5 SWRV6 SWRV7 SWRV6 SWRV7 SWRV7 SWRV7 SWRV7 SWRV7 SWRV7 SWRV7 SWRV5 SWRV7 SWRV3 SWRV3 SWRV3 SWRV3 SWRV3 SWRV3 SWRV5 SWRV5 SWRV5 SWRV5 SWRV5 SWRV7 SWRV5 SWRV5 SWRV5 SWRV7 SWRV5 SWRV | 510 GAAATTGACCTATT G. A. A. A. A. A. A. A. C.T.A. C.A.A. C.A. C.A. C.A. C.A. C.A. C.A. C. C.A. C. | 520 TAGATCATAAI C T T T C T T C T | 530 | 540 | 550 | 560 | 570 | 580 | 590 | |
| EF 560709 EF 672587 GU296412 EF 672615 JQ713649 GU199195 EF 990688 GU199195 EF 990688 GU199195 CH 990688 GU199197 DQ494401 QU394402 GU827413 KC117144 KC117145 KC117145 KC117146 EF 560709 EF 672587 GU199489 EF 672615 JQ713649 GU199195 EF 990688 GU199195 EF 990688 GU199195 EF 990696 GU19917 DQ494401 DQ494402 GU1991744 CK117141 KC117141 KC117141 KC117141 | Human Dhaka6 Human IAL28 Human FAH136 Human ST3 Human K8 Pig Gottfried Pig A131 pig RU172 Pig A253 Pig YM Bovine KJ74 Bovine KJ74 Bovine KJ74 Bovine KJ74 SWRV2 SWRV3 SWRV4 SWRV5 SWRV6 SWRV5 SWRV6 SWRV5 SWRV6 SWRV7 SWRV6 SWRV7 SWRV6 SWRV7 SWRV7 SWRV7 SWRV8 SWRV7 SWRV8 SWRV7 SWRV8 SWRV4 SWR136 Human ST3 Human K8 Pig Gottfried Pig A131 pig RU172 Pig A253 Pig YM Bovine KJ44 Bovine KJ45 SWRV3 SWRV3 SWRV3 | 510 GAAATTGACCTATT G. A. A. A. A. A. C.T.A. GC.A.A. C.A.A. C.A.A. C.A.A. C.A.A. C.A.A. C.A.A. C.A.A. C.A.A. C.A.A. C.A. C.G. C.A. C.G. C.G. C.G. C.G. | 520 TAGAT CATAAA C T C C T C C T C C T C C T C T C T C T C T C T C T T C T | 530 ATTAATGCCTAT | 540 | 550 | 560 | 570 | 580 | 590 CATTTCAGATG .C | 600 IA G G G G G G G G G G G G G |
| EF 560709 EF 672587 GU296412 EF 672615 JQ713649 GU199489 EF 990688 GU199195 EF 990686 GU19917 DQ494402 GU827413 KC117140 KC117141 KC117144 KC117144 KC117145 KC117146 EF 560709 EF 672587 GU296412 EF 672615 JQ713649 GU199459 EF 990686 GU199157 GU296412 EF 990686 GU1991517 DQ494401 DQ494402 GU827413 KC117140 KC117141 KC117142 | Human Dhaka6 Human IAL28 Human ST3 Human ST3 Human K8 Pig Gottfried Pig A131 pig RU172 Pig A253 Pig YM Bovine KJ44 Bovine KJ44 Bovine KJ44 Bovine KJ45 SWRV4 SWRV5 SWRV5 SWRV5 SWRV5 SWRV7 Human Dhaka6 Human IAL28 Human ST3 Human K8 Pig Gottfried Pig A131 Pig RU172 Pig A253 Pig YM Bovine KJ44 Bovine KJ75 Cat BA222 SWRV1 SWRV3 SWRV4 SWRV5 SWRV4 | 510 GAAATTGACGTATT | 520 TAGAT CATAAA TAGAT CATAAA | 530 ATTAATGCCTAT ATTAATGCCTAT | 540 | 550 | 560 | 570 | 580 | 590 CATTTCAGATG .C | 600 I I A G G G G G G G G G G G G G |
| EF 560709 EF 672587 GU296412 EF 672615 JQ713649 GU199489 EF 990688 GU199195 EF 990688 GU199197 DQ494401 DQ494402 GU827413 KC117140 KC117142 KC117142 KC117145 KC117146 EF 560709 EF 672587 GU296412 EF 672587 GU296412 EF 672587 GU296412 EF 672587 GU296412 EF 672587 GU296412 EF 672587 GU296412 EF 67261 GU19919517 DQ494402 GU19919517 DQ494402 GU292113 KC117140 KC117142 KC117142 | Human Dhaka6 Human IAL28 Human ST3 Human ST3 Human K8 Pig Gottfried Pig A131 pig RU172 Pig A253 Pig YM Bovine KJ44 Bovine KJ75 Cat BA222 SWRV1 SWRV2 SWRV3 SWRV4 SWRV4 SWRV5 SWRV5 SWRV5 SWRV5 SWRV6 Human IAL28 Human K3 Pig Gottfried Pig Gottfried Pig Gottfried Pig A131 pig RU172 Pig A253 Pig YM Bovine KJ44 Bovine KJ75 Cat BA222 SWRV1 SWRV3 SWRV4 SWRV5 SWRV3 SWRV4 SWRV3 SWRV4 SWRV3 SWRV4 SWRV5 SWRV3 SWRV5 SWRV5 SWRV5 SWRV5 SWRV5 SWRV6 | 510 GAATTGCCTATT | 520 TAGATCATAAI TAGATCATAAI | 530 IIII. ATTAATGCCTAT G. | 540 | 550 | 560 | 570 | 580 | 590 CATTTCAGATG' G C C C C C C C C C C C C C | 600 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 |

| | 710 720 730 740 750 760 770 780 790 800 |
|---|---|
| EF560709 Human Dhaka6 | TTGCTAACCATGCAGATAGAGTATTTGCTACATATAAGAATAATGCTAAGAGTGGTAATACTACTGATTTCAATTTGCTAGACCAAAGAATTATTTGGCA |
| EF672587 Human IAL28 | |
| 60296412 Human PAH136 FF672615 Human ST3 | |
| J0713649 Human K8 | C. T. C. C. C. GT. T. G. T. A. |
| GU199489 Pig Gottfried | |
| EF990688 Pig A131 | .AA. TAC |
| GU199195 pig RU172 | |
| EF990696 Pig A253 | .A. A. T. C |
| 00199317 Pig 1M D0494401 Boyine KT44 | |
| DQ494402 Bovine KJ75 | \mathbf{T} , \mathbf{C} , \mathbf{C} , \mathbf{C} , \mathbf{C} , \mathbf{A} , \mathbf{C} , \mathbf{GTC} , \mathbf{T} , \mathbf{A} , \mathbf{T} , \mathbf{A} |
| GU827413 Cat BA222 | . C T |
| KC117140 SWRV1 | ATC |
| KC117141 SWRV2 | A. T. C |
| KC117142 SWRV3 | |
| KC117143 SWRV4 | |
| KC117145 SWRV6 | A. T. C |
| KC117146 SWRV7 | |
| | |
| | 810 820 830 840 850 860 870 880 890 900 |
| FFF(0700 Kmar Nbaba(| |
| EF672587 Human TAL28 | |
| GU296412 Human PAH136 | C |
| EF672615 Human ST3 | |
| JQ713649 Human K8 | |
| GU199489 Pig Gottfried | GCC |
| EF990688 Pig A131 | GTT.A.CCTT.GC.G.CTCC.T. |
| EF990696 Pig A0172 | G C T T G C G C T C C C T |
| GU199517 Pig YM | |
| DQ494401 Bovine KJ44 | GCTCTCCCA |
| DQ494402 Bovine KJ75 | GC |
| GU827413 Cat BA222 | |
| KC117140 SWRV1 | |
| KC117141 SWRV2 | с |
| KC117142 SWRV4 | G C TC G G C A A T |
| KC117144 SWRV5 | GGC.TC.GGC.A.T |
| KC117145 SWRV6 | GT |
| KC117146 SWRV7 | GC |
| | |
| | 910 920 |
| EF560709 Human Dhaka6 | AAA GGA T T G T CAA C T GA TA GAAAAA T |
| EF672587 Human IAL28 | ······································ |
| GU296412 Human PAH136 | |
| EF672615 Human ST3 | · · · · · C · · · · · · · · · · · · · · |
| JU713649 Human K8 CU199489 Dig Cottfried | |
| EF990688 Pig A131 | G C |
| GU199195 pig RU172 | |
| EF990696 Pig A253 | · G · C · |
| GU199517 Pig YM | |
| DQ494401 Bovine KJ44 | c |
| JU4944U2 Bovine KJ75 GU897413 Cat PA999 | |
| KC117140 SWRV1 | |
| KC117141 SWRV2 | |
| KC117142 SWRV3 | |
| KC117143 SWRV4 | ······C······························· |
| KC117144 SWRV5 | |
| KC117145 SWRV6 | |
| KUII/146 SWRV7 | |

Segue abaixo o alinhamento de uma área consensual de 309 aminoácidos de comprimento do gene codificador da NSP2 das amostras geradas neste estudo e as demais do Genbank representativas dos genotipos N da NSP2:

| | | | | | | | | | | continu | a |
|------------------------|----------------------------|--------------|---------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------|-----------------------|---------------------------------------|--|-----------------------------------|-----|
| | | | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 | 80 9 | 20 |
| FF560700 | Kuman Dhaka6 | | | | | . | | | | | ļ |
| EF 300709 EF 672587 | Human TAI 28 | MAELACT C. | TENLENDST | NE LEE MAI | AIRCEL IA | KUDKKDUDKE I. | T | VULKER INTSD | NSKOPALEI . | W W | 2 |
| GU296412 | Human PAH136 | | | | | | | | | | 2 |
| EF672615 | Human ST3 | | | | | | I | K. N. | | v | 2 |
| JQ713649 | Human K8 | | | s | | | | к | | | |
| GU199489 | Pig Gottfried | | | s | | | | | FS | | |
| EF990688 | Pig A131 | L. | K] | I .S | I | | | H.KN. | E.FS | I | |
| GU199195 | pig RU172 | ••••• | · · · · · · · · · · · · · · · I | R | • • • • • • • • • | ••••• | · · · I · · · · · · · | | | ·····V····· | |
| EF990696 | Pig A253 | L. | K | s | I | ••••• | | | FS | | • |
| GU199517 | Pig YM | | | | | ••••• | | с к м. | · · · · · · · · · · · · · · · · · · · | · · · · · · · · M · · · · · · · · | 1 |
| D0404401 | Bovine KJ44 Bovine KT75 | | | · · · · · · · · · · · · · · · · · · · | | ••••• | | | F2 | | 1 |
| CU827413 | Cat BA222 | | | s. c | | | т | K | | | |
| KC117140 | SWRV1 | | | | | | | K. N | | | 1 |
| KC117141 | SWRV2 | | | | | | | | FS | M | 2 |
| KC117142 | SWRV3 | | | | | | I | | | A | 2 |
| KC117143 | SWRV4 | | | s. | | | | к | | A.V. | |
| KC117144 | SWRV 5 | | | s. | | | . I | к | | A.V. | |
| KC117145 | SWRV6 | | | | | | | | FS | M | |
| KC117146 | SWRV7 | | | | | | | | F 5 | M | |
| | | | | | | | | | | | |
| | | | 100 | 110 | 120 | 130 | 140 | 150 | 160 | 170 1 | 80 |
| | | | . | | | . | | | | | 1 |
| EF360709 | Human Dhakab | IKVTUSEV | MATZKAAZA | RHLENLY | /LRKENHŲD | WLFHSKELLLK | SALTUTEÔSK | SIETTATAEGG | E IAL ÛNVEL. | MWKL TYL DHKLMP II | - |
| GH996419 | Human PAH136 | F | | | | | | | ••••• | | |
| EF672615 | Human ST3 | L D . | | | | | | | | | |
| J0713649 | Human K8 | D. | | | | | | | | | 2 |
| GU199489 | Pig Gottfried | D . | | | | | A | | | | |
| EF990688 | Pig A131 | D . | | | | F . | A | E | н | | |
| GV199195 | pig RU172 | I D L | | | | | .1 | | | | |
| EF990696 | Pig A253 | D . | | | | · · · · · · · · · · · F · | A | E | • • • • • • • • • • • | | |
| GU199517 | Pig YM | D . | .s | • • • • • • • • | • • • • • • • • • | | A | | ••••• | •••••• | • |
| DQ494401 | Bovine KJ44 | D . | • • • • • • • • • • | ••••• | ••••• | •••••• | A | • • • • • • • • • • • | ••••• | ••••••• | • |
| DQ494402 | Bovine KJ75 | D. | | | | | A | • • • • • • • • • • • | ••••• | | ۰. |
| 60827413 | Cat BA222 | PDL | r.1 | | · · · · · · · · · · · · · · · · · · · | | | | | | ۰. |
| KC117140 | SWRV1 | D. | | | | | a | | ····· | R | • |
| KC117142 | SWRV3 | | | | | W | т. | | | | 1 |
| KC117143 | SWRV4 | V.IDL | | | | R | I . | | | | 2 |
| KC117144 | SWRV 5 | V.IDL | | | | R | I | | | | |
| KC117145 | SWRV6 | D . | | | | | A | | | E | |
| KC117146 | SWRV7 | D . | | | | | A | | | E | |
| | | | | | | | | | | | |
| | | | 190 | 200 | 210 | 220 | 230 | 240 | 250 | 260 2 | 70 |
| FF560700 | Waman Dhaka6 | DOWETEVE | | | | | | | | | 1 |
| EF672587 | Human TAL 28 | Dour Inter | W. | HT | S | | | F | S. WI | E. | ÷., |
| GII296412 | Human PAH136 | | | C I | | | | | | | 1 |
| EF672615 | Human ST3 | | | cI | | | | | | | 2 |
| JQ713649 | Human K8 | | | c I | | A | I | | v. | | |
| GU199489 | Pig Gottfried | | | cI | | s.I | | | v | | |
| EF990688 | Pig A131 | | . R | ACI | | | •••••• | I | v | • .L | |
| GU199195 | pig RU172 | ••••• | v | IHII | s | .к | ••••• | F | SVI | E | |
| EF990696 | Pig A253 | ••••• | . R | ACI | · · · · · · · · · · | ••••• | ••••• | ••••• | v | I | ۰. |
| GU199517 | Pig YM | ••••• | •••••• | cI | | •••••• | •••••• | ••••• | •••••••••••••••••••••••••••••••••••••• | •••••• | ۰. |
| DQ494401 | Bovine KJ44 Rovine KJ75 | ••••• | ••••• | ACI | | | ••••• | | ······································ | ••••• | 1 |
| 611827412 | Cat BA222 | | | H T | TS | ĸ | т. | TP TP | S N V | Е | 1 |
| KC117140 | SWRV1 | | | . мс. т | | | | | Т | | 1 |
| KC117141 | SWRV2 | | | . мс 1 | | | | | I | | |
| KC117142 | SWRV 3 | | v.v | н 1 | | .ĸ | | F | I | E | |
| KC117143 | SWRV4 | | v | HII | | .к | | F | I | E | |
| KC117144 | SWRV 5 | ••••• | v | HII | | . K | ••••• | F | I | E | |
| KC117145 | SWRV6 | ••••• | •••••• | мс 1 | | A | •••••• | · · · · · · · · · · · · · · · · · · · | v | ••••• | |
| KC117146 | SWRV7 | | | мс I | | A | | | V. | | |

conclusão

| | | | 280 | 290 | 3 | 00 | |
|----------|---------------|---------|-----------------|----------|---------|----------|---|
| | | | | | - | | - |
| EF560709 | Human Dhaka6 | AFTSSMK | ÎGNLIDAC | KKLLFŰKM | KÜEKNEI | FKGLSTDR | ĸ |
| EF672587 | Human IAL28 | | L | .R | | | ÷ |
| GU296412 | Human PAH136 | | A L | | | | ÷ |
| EF672615 | Human ST3 | | L | N. | К. | N. | ÷ |
| JQ713649 | Human K8 | | L | | | | |
| GV199489 | Pig Gottfried | | L | | | | |
| EF990688 | Pig A131 | IR | (.T.L | | | .R | |
| GV199195 | pig RU172 | | L | .R | | | |
| EF990696 | Pig A253 | IR | ί.Τ.L | | | .R | |
| GV199517 | Pig YM | | L | | | | |
| DQ494401 | Bovine KJ44 | | L | | | | |
| DQ494402 | Bovine KJ75 | | L | | | | |
| GU827413 | Cat BA222 | | L | .R | | | |
| KC117140 | SWRV1 | | L | | | | |
| KC117141 | SWRV2 | | L | | | | |
| KC117142 | SWRV3 | | L.I. | .R | | | |
| KC117143 | SWRV4 | | L | .R | | | |
| KC117144 | SWRV 5 | | L | .R | | | |
| KC117145 | SWRV6 | | L | | | | |
| KC117146 | SWRV7 | | L | | | | |

APÊNDICE C

O alinhamento do fragmento completo de 594 nucleotídeos do gene codificador da NSP5 de rotavírus suínos, contemplando as amostras geradas neste estudo com as demais do Genbank representativas dos genotipos H da NSP5, segue abaixo:

| | | | | | | | | | con | tinua |
|---|---------------------------------------|---------------------------|---|---|---------------------------|---------------------|---------------------------------|-----------------------|-----------------------|------------------|
| | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 | 80 | 90 | 100 |
| | | | | | | | | | | |
| GU199491 Pig Gottfried | ATGTCTCTCAGCATI | GACGTAACGA | BTCTTCCCTC | AATTTCTTCT | AGTATCTTTAA | AAATGAATC | GTCTTCCACA | ACGTCAACTC | TCTCTGGAAA | ATCTA |
| D0916134 Pig A131 | | | A6 | CCAA | | | т | | т. | |
| EF990698 Pig A253 | | т | AG | С. С. А. А | | | т. | | .т | |
| DQ204739 Pig RU172 | | | | | | | T G | | .т | |
| EF672618 Human ST3 | | A . | | | | | T | <mark>.</mark> G | . T | |
| EF672590 Human IAL28 | ••••• | • • • • • • • • • • • • | • • • • • • • • • • • | • • • • • • • • • • • | c | • • • • • • • • • | T | • • • • • • • • • • | .T | ••••• |
| DU146698 Human L26 FE560210 Human Dhaka6 | | A. | • • • • • • • • • • • • • | ••••• | | | · · · · · · · · · · · · · · · · | ••••• | · T · · · · · · · · | |
| D0146681 Human Matlab13 | | A. | | | | | ····· | | · T · · · · · · · · · | |
| KC117147 SWRV1 | | | | | т.с. | | т. | | .т | |
| KC117148 SWRV2 | | | | | тс | | т | | .т | |
| KC117149 SWRV3 | | | | | T <mark>C</mark> | | . T | | . T | |
| KC117150 SWRV4 | ••••• | • • • • • • • • • • • • • | • • • • • • • • • • • | • • • • • • • • • • • | T <mark>C</mark> | • • • • • • • • • | · · · · · T · · · . | • • • • • • • • • • | .T | ••••• |
| KC117151 SWRV5 | ••••• | | ••••• | ••••• | TC | ••••• | · · · · · · T · · · | ••••• | .T | |
| KC11/152 S#R08 | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | |
| | 110 | 120 | 130 | 140 | 150 | 160 | 170 | 180 | 190 | 200 |
| GU199491 Pig Gottfried | TTGGTAGGAGTGAA | CAGTACATTTC | ACCAGATGCA | GAAG <mark>CATTC</mark> A/ | ATAAATA CATO | CTGTCGAAG | <mark>FCTCC</mark> AGAGG | ATATTGGACC. | ATCTGATTCT | GCTTC |
| EF990690 Pig A131 | .GGAA | • • • • • • • • • • • • • | ••••• | •••••••• | • • • • • • • • • • • • | T.T | • • • • • • • • • • • • | • • • • • • • • • • • | c | •••• |
| DQ916134 Pig CMP034 | | | ••••• | •••••• | •••••• | T | ••••• | ••••• | | ••••• |
| E1990090 FIG A233 D0904739 Dig DU179 | . G G A A | | | | | T | ••••• | | •••••• | |
| EF672618 Human ST3 | | | | | | Τ | | | | |
| EF672590 Human IAL28 | | TG | . T CATC | | G | Τ | | | | |
| DQ146698 Human L26 | ••••• | | | • • • • • • • • • • • | | т | • • • • • • • • • • • • | | | |
| EF560712 Human Dhaka6 | ••••• | • • • • • • • • • • • • • | ••••• | • • • • • • • • • • • | ••••• | Τ | ••••• | • • • • • • • • • • | • • • • • • • • • • | •••• |
| DQ146681 Human Matlab13 | •••••• | ••••• | ••••• | ••••• | G | T | ••••• | ••••• | • • • • • • • • • • • | ••••• |
| KC117147 SWRV1 KC117148 SWDV9 | AC | | | • | •••••• | T | ••••• | | ••••• | |
| KC117140 SWRV2 | | | | | | Τ | | | | |
| KC117150 SWRV4 | | | | | | Τ | | A | | |
| KC117151 SWRV5 | ••••• | | | | | т | | A | | |
| KC117152 SWRV6 | ••••• | | • • • • • • • • • • • | •••••••• | | т | • • • • • • • • • • • • | • • • • • • • • • • • | • • • • • • • • • • • | •••• |
| | 210 | 220 | 230 | 240 • • • • • • • • • | 250 | 260 | 270 | 280 | 290 | 300 I |
| EF990690 Pig 600011120 | T | G A | TA A | AI GCAGI IAA | BACAAAI GCAU | ACBCIEBCE | IGICIAI GGA | TICATCOACO | CAATCACGAC | CIICA |
| D0916134 Pig CMP034 | | | · · · · · · · · · · · · · · · | | | | | | | |
| EF990698 Pig A253 | T A | G | | | | | | т | | |
| DQ204739 Pig RU172 | T | | | | | | | | | |
| EF672618 Human ST3 | · · · · · · T · · · · · · | ••••• | • • • • • • • • • • • | •••••• | G. | • • • • • • • • • • | • • • • • • • • • • • | • • • • • • • • • • • | • • • • • • • • • • | ••••• |
| EF672590 Human IAL28 | · · · · · · · · · · · · · · · · · · · | T | ••••• | ••••• | • • • • • • • • • • • • • | . T | ••••• | AA | ••••• | ••••• |
| FF560712 Human Dbaka6 | T | | | | •••••••••• | | | ••••• | | |
| DQ146681 Human Matlab13 | T | | | | | | | A | | |
| KC117147 SWRV1 | T | | | | | . T | | AA | | |
| KC117148 SWRV2 | · · · · · T · · · · · · | •••••• | | ••••• | | . T | ••••• | AA | • • • • • • • • • • | |
| KC117149 SWRV3 | · · · · · · T · · · · · · | •••••• | • • • • • • • • • • • | •••••• | ••••••••• | . T | ••••• | A A A. | • • • • • • • • • • | •••• |
| KC11715U SWRV4 | | | | | •••••• | | ••••• | ••••• | ••••• | |
| KC117152 SWRV5 | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | |
| | 310 | 320 | 330 | 340 | 350 | 360 | 370 | 380 | 390 | 400 |
| | | | | [] . | | | [| | | |
| GU199491 Pig Gottfried | AGCAACGTTGGGTGG | GATCAAGTGG | ATTTCTCCTT | AACTAAAGGT/ | ATTAATGTTAG | TGCTAATCT | IGATTCATGT. | ATATCAATCT | CGACTGATCA | TAAAA |
| EF990690 P1g A131 D0916134 Dig (MD034 | | r | A C. | GC | · | | | 6 | .дд. | · · · · · |
| EF990698 Pig A253 | T | | . А. С. | G C | AA. | | | G | .A | |
| DQ204739 Pig RU172 | | | | | | | | | .AG | C G. |
| EF672618 Human ST3 | A | т | | | | | | T . | .A | G. |
| EF672590 Human IAL28 | | A | | ••••• | | G | | G <mark>T</mark> . | .AA | G. |
| DQ146698 Human L26 | A1 | r r | ••••• | ••••• | | ••••• | G | ••••••• | .A | G. |
| ErobU712 Human Dhaka6 | A | | •••••• | | •••••• | ••••• | ••••• | · · · · · · · · · | .H | G. |
| KC117147 SWRV1 | · · · · · · · · · · · · · · · · · · · | | | | Б <mark>с</mark> а | | | | .AC | |
| KC117148 SWRV2 | | | | | GCA | C | | T | .AC | G. |
| KC117149 SWRV3 | | | | | GCA | | c | т | .A | G. |
| KC117150 SWRV4 | | | | | | ••••• | C | . A. | .A | <mark>G</mark> . |
| KC117151 SWRV5 | ••••••••••••• | • • • • • • • • • • • • • | ••••••••••••••••••••••••••••••••••••••• | ••••• | • • • • • • • • • • • • | ••••• | c | A. | .A | G. |
| KUII/IDZ SWRV6 | | | <mark>.</mark> | | | | C | в Т. | .aC | . |

| | | 410 | 420 | 430 | 440 | 450 | 460 | 470 | 480 | 490 500 | J |
|---------------------------------------|---------------------------|---------------------------------------|---------------|---------------------|---------------------------------|-------------------------|---------------------------------------|-------------------------------|-----------------------|---------------------------------------|---|
| CU100401 Dia Co4 | theminal ACC | | | | | | | | | | |
| 60199491 Pig 600 EE000600 Dig A13 | currieu Acc | C C C C C C C C C C C C C C C C C C C | TOA TAAAAG TA | BURAACAC IA | CCCGAGAAII | SAAGCAGAII(| - IGATICIGAA | GATIAIGITI | IAGAIGAIIC | AGAIAGIGAIGA | |
| EC990090 PIG ALS | JL G | | ····· | .A | cA | | · · · A · · · · · | | | | |
| DU910134 PIG CAR EE000608 Dig A00 | FUJ4 | | | | | | | | | | |
| EC990090 PIG AZ: D0004730 Dig DU | | | ····· | .A | cA | | A | | | | |
| DQ204739 PIG R03 EE670619 Wampan 6 | 1/2 ETTO A | · · · · · · · · · · · · · · · · · · · | ••••• | | | • • • • • • • • • • • • | ••••• | · · · · · · · · · · · · · · · | | | |
| EF672590 Human 1 | 51.5 .A. TAT 99 | тас | | | A | • • • • • • • • • • • • | ••••• | | | | |
| D0146698 Human I | 196 | | | A | · · · · · · · · · · · · · · · · | | | | G | · · · · · · · · · · · · · · · · · · · | |
| FF560719 Human I | | · · · · · · · · · · · · · · · · · · · | | | | | | | G | | |
| D0146681 Human N | Viatlah13 | | | | | | | | G | | |
| KC117147 SWDV1 | Additabits | а | c | | | | с. | c | | | |
| KC117148 SWRV2 | | а | c | | A | | c | c | | | |
| KC117149 SWRV2 | | а | | | A | | •••••• | с | | | |
| KC117150 SWRV4 | | А. | | | т | | | с. | | с. | |
| KC117151 SWRV5 | | А | | | т | | | с. | | | |
| KC117152 SWRV6 | | | | | Т | | c c | с. | | | |
| | | | | | | | | | | | |
| | | 510 | 520 | 530 | 540 | 550 | 560 | 570 | 580 | 590 | |
| GU199491 Pig Got | ttfried <mark>C</mark> GG | TAAATGTAAGAAT1 | GTAAATATAA | GAAAAAGTAT | TTCGCACTAA | GAATGAGGATC | AAGCAAGTCG | CAATGCAATT | GATCGAAGAT | TTGTAA | |
| EF990690 Pig A13 | 31 | | | G <mark>.</mark> G. | T. | | | c. | T | | |
| DQ916134 Pig CME | PO34 | | | | | . | T . | | | | |
| EF990698 Pig A23 | 53 | | | GGC | | G | | c. | T | | |
| DQ204739 Pig RU1 | 172 | | | | т | | | | | T | |
| EF672618 Human S | ST3 | | | A | T | <mark>.</mark> | · · · · · · · · · · · · · · · · · · · | | | | |
| EF672590 Human] | IAL28 | | | GA | T | <mark>.</mark> | A | | <mark>.</mark> A | | |
| DQ146698 Human I | L26 | | | | | <mark>.</mark> | G | | · · · · · · · · · · · | | |
| EF560712 Human I | Dhaka6 | | C | | | <mark>.</mark> | G | | · · · · · · · · · · · | | |
| DQ146681 Human N | Matlab13 | | | | | <mark>.</mark> | G | | · · · · · · · · · · · | | |
| KC117147 SWRV1 | | | Ci | AGA <mark>.</mark> | T T | <mark>.</mark> | · · · · · · · · · · · · · · · · · · · | | · · · · · · · · · · · | | |
| KC117148 SWRV2 | | | Ci | AGA <mark>.</mark> | T T | <mark>.</mark> | · · · · · · · · · · · · · · · · · · · | | · · · · · · · · · · · | | |
| KC117149 SWRV3 | | | Ci | AGA <mark>.</mark> | T T | <mark>.</mark> | · · · · · · · · · · · · · · · · · · · | | · · · · · · · · · · · | | |
| KC117150 SWRV4 | Τ | | G | • • • • • • • • • • | T | <mark>.</mark> | | • • • • • • • • • • | | | |
| KC117151 SWRV5 | Τ | | G | • • • • • • • • • • | T | <mark>.</mark> | | • • • • • • • • • • | | | |
| KC117152 SWRV6 | | | | c | T | · · · • • · · · • • • | · · · · · · · · · · · · · · · · · · · | • • • • • • • • • • | | | |
| | | | | | | | | | | | |

Segue abaixo o alinhamento de uma área consensual de 197 aminoácidos de comprimento do gene codificador da NSP5 das amostras geradas neste estudo e as demais do Genbank representativas dos genotipos H da NSP5:

| | | 10 | 20 | 3 | 0 40 | 50 | 60 | 70 | 80 | 90 100 |
|--|--|-------------------------|-------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------|---------------------------------------|---|------------------------|
| C1/1 0 0 4 0 1 | Dig Cottfried | MCI CTRUTCI I | | CCCMMCMT C | CRETCREPORT | | | CUDDI TOPOT | CHAVETNADA | |
| 50133431 FE000600 | Fig Buttifieu | MSLSIDVISL | - 31 33311 Kut | 3331131123 | M D | SP DALAT NATED | D CORDE DI CE SDO | ASHDELISESI | KSHAVKIHADA | 50 SELD 3 5 1 Q SICE 5 |
| D0016134 | Pig AIJI | | | | · · · · · · · · · · · · · · · · · · · | | | ···· . | | |
| D0310134 | Pig CAPU34 | | | | | | | | | |
| EF 990696 | PIG AZJJ | | | | | | •••••• | · · · · · · · · · · · · · · · · · · · | • • • • • • • • • • • • • | ••••• |
| DU204739 | Pig R01/2 | | | · · · · · · · · · · · · · · · · · · · | | | •••••• | | •••••• | ••••• |
| EF6/2010 | Human SIS | | | | | · · · · · · · · · · · · · · · · · · · | | | •••••• | |
| EF672590 | Human LAL 28 | ••••• | | | · · · · · · · · · · · · · · · · · · · | | | ••••• | • | |
| DÜ146698 | Human L26 | ••••• | | | | | | ••••• | • • • • • • • • • • • • • • | |
| EF560712 | Human Dhaka6 | ••••• | • • • • • • • • • • • | | ••••• | | •••••• | ••••• | • • • • • • • • • • • • | ••••• |
| DQ146681 | Human Matlab13 | ••••• | • • • • • • • • • • • • | | ••••• | ••••• | •••••• | ••••• | • • • • • • • • • • • • | ••••• |
| KC117147 | SWRV1 | ••••• | • • • • • • • • • • • • | | · · · · · · N · · · · | ••••• | •••••• | ••••• | • • • • • • • • • • • • | ••••• |
| KC117148 | SWRV2 | ••••• | • • • • • • • • • • • | | · · · · · · N · · · · | ••••• | •••••• | • • • • • • • • • • • | • • • • • • • • • • • • | ••••• |
| KC117149 | SWRV3 | ••••• | | | · · · · · · N · · · · | ••••• | • • • • • • • • • • • • • | • • • • • • • • • • • | • • • • • • • • • • • | ••••• |
| KC117150 | SWRV4 | ••••• | • • • • • • • • • • • | | ••••• | • • • • • • • • • • • • | E | • • • • • • • • • • • | • • • • • • • • • • • • | ••••• |
| KC117151 | SWRV5 | • • • • • • • • • • • • | | | • • • • • • • • • • • • | • • • • • • • • • • • | E | • • • • • • • • • • | • • • • • • • • • • • | ••••• |
| KC117152 | SWRV6 | ••••• | • • • • • • • • • • • | | • • • • • • • • • • • • | ••••• | ••••••• | •••• | • • • • • • • • • • • • | ••••• |
| | | | | | | | | | | |
| | | 110 | 0 120 | 13 | 30 140 | 150 | 160 | 170 | 180 | 190 |
| C1/1 0 0 4 0 1 | Dig Cottfried | SHUCCHUNK | | | | | | | | |
| 50133431 FE000600 | Fig Buttifieu | SHOCDQUDE: | SLINULINU SAL | LDSCISISI | N D F | T | P | DUGRCERICKIE | DC V | SAMIOU TEDU |
| D0016134 | Dia (100024 | | | | .n.к.ь | | | | | |
| D0310134 | PIG CAPUS4 | | | | | | | | | |
| EF 990696 | FIG AZJS | | | | NY TO | T | | ••••• | DC 1 | |
| DU204739 | Dia D10170 | | | · · · · · · · · · · | .NE | I | .E | | .RCV | |
| EL012010 | Pig RU172 | | | · · · · · · · · · · · · · · · · · · · | .NE | I | .EI | | .RCV | F |
| EEC30500 | Pig RU172 Human ST3 | L | | v | .NE | IYK | .EI | | .RCV | F |
| EF672590 | Pig RU172 Human ST3 Human IAL28 | L | | v | . N Е N | IK | .EI | | .RCV. | F |
| EF672590 DQ146698 | Pig RU172 Human ST3 Human IAL28 Human L26 | Ц. | | V | .NE | IYK | .EI | | .RCV | F |
| EF672590 DQ146698 EF560712 | Pig RU172 Human ST3 Human IAL28 Human L26 Human Dhaka6 | L. | | V | . N E | IYK. .KK. | .E | | .RCV. | F R |
| EF672590 DQ146698 EF560712 DQ146681 | Pig RU172 Human ST3 Human IAL28 Human L26 Human Dhaka6 Human Matlab13 | L. | | V .E | . N E | I¥. K .K. K. | .E | | .RCV | F R R R |
| EF672590 DQ146698 EF560712 DQ146681 KC117147 | Pig RU172 Human ST3 Human IAL28 Human L26 Human Dhaka6 Human Matlab13 SWRV1 | | | V .E | . м Е м | IYK .KK. | .E | | .RCV. | F R R |
| EF672590 DQ146698 EF560712 DQ146681 KC117147 KC117148 | Pig RU172 Human ST3 Human IAL28 Human L26 Human Dhaka6 Human Matlab13 SWRV1 SWRV2 SWRV2 | | | V | .NE | I¥K | .E | | .RCV | R |
| EF672590 DQ146698 EF560712 DQ146681 KC117147 KC117148 KC117149 | Pig RU172 Human ST3 Human IAL28 Human IAL26 Human Dhaka6 Human Matlab13 SWRV1 SWRV2 SWRV3 | L. | | | . N Е N | IY. K .K. K. | .E | | .RCV | R |
| EF672590 DQ146698 EF560712 DQ146681 KC117147 KC117148 KC117149 KC117150 | Pig RU172 Human ST3 Human IAL28 Human L26 Human Matlab13 SWRV1 SWRV2 SWRV3 SWRV4 | | | | . N Е Н | I¥K .KK | .E | | .RCV. | RR |
| EF672590 DQ146698 EF560712 DQ146681 KC117147 KC117148 KC117149 KC117150 KC117151 | Pig RU172 Human ST3 Human LAL28 Human Daka6 Human Daka6 Human Matlab13 SWRV1 SWRV2 SWRV3 SWRV4 SWRV5 | L. | | | . не | I | .E | | .RC♥ | RR. |

conclusão

APÊNDICE D

O alinhamento do fragmento completo de 279 nucleotídeos do gene codificador da NSP6 de rotavírus suínos, contemplando as amostras geradas neste estudo com as demais do Genbank, segue abaixo:

| | | | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 | 80 | 90 100 |
|------------|------------|-------------------|--------------------------|-----------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------|-----------------------|---------------------------------------|
| B0016124 | Dém | | . | | | | | . | | . | |
| D0310134 | Pig Dén | ATGAATCG | ICTICIACA | АСБТСААСТС | TTTCTGGAAAA | ATCIATIGGI | Аврартванся | GIACATITCA | CCAGATOCA | MAGCATICAR | TAAATACATGTT |
| JE 796722 | Pig Dia | | • • • • • • • • • • | | | | •••••• | | ••••• | | |
| JE 790700 | Pig | | | | | | | | m amo | | |
| M1773020 | Numan | | | | | | AC | IG | TAIC. | | |
| 10(7727776 | Numan | | ••••• | | | | AC | | n and | | |
| M1773770 | ЛШПАЛ | | | | | | AC | | 1AIC | | |
| AM773710 | numan | | | | | | •••••• | | | | |
| A1/09094 | numan | | . T | | ••••••••••• | | ••••• | | ••••• | ····T···· | |
| EF183863 | Human | | . T | | •••••• | ••••• | •••••• | | ••••• | · · · · T · · · · · | |
| DU838628 | SIMIO | ••••• | A | | | ••••• | •••••• | | ••••• | | · · · · · · · · · · · · · · · · · · · |
| JF791805 | SIMIO | | · · · · · A · · · | | ••••• | ••••• | ••••• | | ••••• | | · · · · · · · · · · · · · · · · · · · |
| SWRVI | | | • • • • • • • • • • | | | ••••• | AC | | ••••• | | |
| SWRV2 | | ••••• | • • • • • • • • • • | • • • • • • • • • • • | ••••• | ••••• | AC | ••••• | ••••• | | ••••• |
| SWRV3 | | ••••• | • • • • • • • • • • | • • • • • • • • • • • | •••••• | ••••• | AC | ••••• | ••••• | | ••••• |
| SWRV4 | | ••••• | • • • • • • • • • • | • • • • • • • • • • | •••••• | • • • • • • • • • • • | ••••• | ••••• | ••••• | • • • • • • • • • • • | ••••• |
| SWRV 5 | | ••••• | • • • • • • • • • • | • • • • • • • • • • | • • • • • • • • • • • • • | • • • • • • • • • • • | ••••• | • • • • • • • • • • • | ••••• | • • • • • • • • • • • | ••••• |
| SWRV6 | | ••••• | • • • • • • • • • • | • • • • • • • • • • | •••••• | • • • • • • • • • • • | ••••• | • • • • • • • • • • • | ••••• | • • • • • • • • • • • | ••••• |
| | | | | | | | | | | | |
| | | | 110 | 120 | 130 | 140 | 150 | 160 | 170 | 180 | 190 200 |
| | | | . | | | | | | | | . |
| DQ916134 | Pig | GTCGAAGT | CTCCAGAGG | ATATTGGACO | CATCTGATTCT | G <mark>CTTCAAAC</mark> G | ATCCACTCACC | AGCTTTTCGA | TTAGATCGA | TGCAGTTAAG | ACAAATGCAGAC |
| JF796722 | Pig | ••••• | ••••• | • • • • • • • • • • | • • • • • • • • • • • • • | • • • • • • • • • • • | . c | •••••• | ••••• | A | ••••• |
| JF796700 | Pig | ••••• | ••••• | • • • • • • • • • • | • • • • • • • • • • • • • | • • • • • • • • • • • | . c | •••••• | ••••• | •••••• | ••••• |
| HM773820 | Human | ••••• | ••••• | • • • • • • • • • • | • • • • • • • • • • • • | • • • • • • • • • • • | • • • • • • • • • • • | T | ••••• | •••••• | · · · · · · · · · · · · · T |
| HM773798 | Human | ••••• | ••••• | | | • • • • • • • • • • • | | T | ••••• | •••••• | T |
| HM773776 | Human | ••••• | • • • • • • • • • • | | | • • • • • • • • • • • | | T | ••••• | • • • • • • • • • • | T |
| HM773710 | Human | ••••• | • • • • • • • • • • | | | • • • • • • • • • • • | | | ••••• | ••••• | |
| AY769694 | Human | AA. | A. | | .Т | AG | | | • • • • • • • • • • | ••••• | T |
| EF185863 | Human | AA. | A. | | .T | AG | | | • • • • • • • • • • | • • • • • • • • • • | T |
| DQ838628 | Simio | ••••• | • • • • • • • • • • | | | • • • • • • • • • • • | | T | | • • • • • • • • • • | · · · · · · · · · · · · · · · · · · · |
| JF791805 | Simio | · · · · · · · · · | • • • • • • • • • • | | | • • • • • • • • • • • | | T | ••••• | | C |
| SWRV1 | | · · · · · · · · · | • • • • • • • • • • | | | • • • • • • • • • • • | | | ••••• | • • • • • • • • • • | T |
| SWRV2 | | · · · · · · · · · | • • • • • • • • • • | | | • • • • • • • • • • • | | | ••••• | • • • • • • • • • • | T |
| SWRV 3 | | · · · · · · · · · | • • • • • • • • • • | | | • • • • • • • • • • • | | | | | . T |
| SWRV4 | | · · · · · · · · · | • • • • • • • • • • | A | | • • • • • • • • • • • • | . c | | ••••• | | |
| SWRV 5 | | | | A | | | . c | | | | |
| SWRV6 | | · · · · · · · · · | • • • • • • • • • • | | | • • • • • • • • • • • | . c | | | | |
| | | | | | | | | | | | |
| | | | 210 | 220 | 230 | 240 | 250 | 260 | 270 | | |
| | | | | | | | | | | | |
| DQ916134 | Pig | GCTGGCGT | G <mark>TCTAT</mark> GGA | TTCATCGACG | GCAATCACGACO | CTTCAAGTAA | <mark>CGTTGGGTGC</mark> G | A <mark>TC</mark> AAGTGGA | TTTCTCCTT(| A | |
| JF796722 | Pig | • • • • • • • • • | • • • • • • • • • • | | • • • • • • • • • • • • | | • • • • • • • • • • • | ••••• | c. | • | |
| JF796700 | Pig | • • • • • • • • • | • • • • • • • • • • | | • • • • • • • • • • • • | GC | •••••• | · · · · · · · · · · · | T.C. | • | |
| HM773820 | Human | • • • • • • • • • | • • • • • • • • • • | AA | | | • • • • • • • • • • • • | A | | L. | |
| HM773798 | Human | • • • • • • • • • | | AA | | | •••••• | A | | L. | |
| HM773776 | Human | • • • • • • • • • | • • • • • • • • • • | AA | | | •••••• | A | | L. | |
| HM773710 | Human | · · · · · · · · · | | A | | | A | T | | | |
| AY769694 | Human | · · · · · · · · · | | AG.A | | A.T.CG. | .A.A.A. | A | | ι. | |
| EF185863 | Human | | | AG.A | | ATCG. | .A.A.A. | A | | L. | |
| DQ838628 | Simio | | | AG.A | | | ГСА | | | L. | |
| JF791805 | Simio | | | AG.A | | | гса . | | | L. | |
| SWRV1 | | | | AA | . | c | | | | ι. | |
| SWRV2 | | | | AA | . | c | | | | ι. | |
| SWRV 3 | | | | AA | . . | c | | | | ι. | |
| SWRV4 | | | | | <mark>.</mark> | c | | | | ι. | |
| SWRV 5 | | | | | | c | | | | ι. | |
| SWRV6 | | | | | | . c | | | | ι. | |
| | | | | | | | | | | | |

Segue abaixo o alinhamento de uma área consensual de 92 aminoácidos de comprimento do gene codificador da NSP6 das amostras geradas neste estudo e as demais do Genbank:

| | | | 1 | 0 | 20 | 30 |) | 40 | 50 | 60 | 70 | 80 | 90 |
|----------|-------|-----------|------|-------------|----------|------------|----------|---------------------|-----------------------------|-----------|--|---------------------|----------|
| | | · · · · I | | | | | | . | | | 1 | | |
| DQ916134 | Pig | MNRLL | QRQL | LENL | LVGVNSTI | FHQMQ KHSI | NTCCRSLQ | RILDHL | .ILLQTI <mark>H</mark> SPAF | RLDRMQLRQ | MQTL <mark>AC</mark> LWI <mark>HI</mark> | RNHDL QVTL | GAIKWISP |
| JF796722 | Pig | | | | | | | | | | | A | |
| JF796700 | Pig | | | | | | | | | | | A | s |
| HM773820 | Human | | | | тм | IS | | | v. | | м |)HA | |
| HM773798 | Human | | | | тм | IS | | | v. | | M |)HA | |
| HM773776 | Human | | | | тм | IS | | | v. | | M |)нА | |
| HM773710 | Human | | | | | R | s | | | | | .нА | D |
| AY769694 | Human | FQ | | | | L | S0N | кL. | HR | | M |)HHLA | DT |
| EF185863 | Human | F0 | | | | L | S0N | к <mark>.</mark> L. | HR | | м |)HHLA | DT |
| DQ838628 | Simio | | | | | | | | v. | | |) <mark>нм</mark> s | D |
| JF791805 | Simio | | | | | | | | v. | | т |) <mark>нм</mark> s | D |
| SWRV1 | | | | | T | | | | | | м |)нА | |
| SWRV2 | | | | | T | | | | | | м |)нА | |
| SWRV 3 | | | | | T | | | | | | M | | |
| SWRV4 | | | | | | | | N | т | | | A | |
| SWRV 5 | | | | | | | | N. | T | | | A | |
| SWRV6 | | | | | | | | | т. | | | A | |
| | | | | | | | | | | | | | |

APÊNDICE E

| | EF560709 | EF672587 | GU296412 | EF672615 | JQ713649 | GU199489 | EF990688 | GU199195 | EF990696 | GU199517 | DQ494401 | DQ494402 | GU827413 | SWRV1 | SWRV2 | SWRV3 | SWRV4 | SWRV5 | SWRV6 | SWRV7 |
|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| EF560709 | ID | 0,925 | 0,957 | 0,948 | 0,967 | 0,957 | 0,902 | 0,922 | 0,922 | 0,961 | 0,961 | 0,961 | 0,906 | 0,954 | 0,957 | 0,925 | 0,925 | 0,925 | 0,951 | 0,951 |
| EF672587 | 0,882 | ID | 0,925 | 0,938 | 0,938 | 0,935 | 0,88 | 0,961 | 0,899 | 0,938 | 0,938 | 0,938 | 0,944 | 0,925 | 0,928 | 0,961 | 0,961 | 0,961 | 0,925 | 0,925 |
| GU296412 | 0,942 | 0,885 | ID | 0,944 | 0,964 | 0,954 | 0,902 | 0,915 | 0,922 | 0,954 | 0,957 | 0,957 | 0,906 | 0,951 | 0,954 | 0,925 | 0,925 | 0,925 | 0,944 | 0,944 |
| EF672615 | 0,911 | 0,871 | 0,906 | ID | 0,957 | 0,954 | 0,899 | 0,935 | 0,919 | 0,961 | 0,957 | 0,957 | 0,902 | 0,951 | 0,954 | 0,925 | 0,922 | 0,922 | 0,951 | 0,951 |
| JQ713649 | 0,923 | 0,876 | 0,912 | 0,899 | ID | 0,977 | 0,919 | 0,928 | 0,938 | 0,97 | 0,977 | 0,977 | 0,925 | 0,961 | 0,964 | 0,935 | 0,938 | 0,938 | 0,967 | 0,967 |
| GU199489 | 0,9 | 0,89 | 0,891 | 0,886 | 0,897 | ID | 0,932 | 0,928 | 0,951 | 0,974 | 0,99 | 0,99 | 0,909 | 0,974 | 0,977 | 0,932 | 0,925 | 0,925 | 0,977 | 0,977 |
| EF990688 | 0,842 | 0,831 | 0,835 | 0,821 | 0,841 | 0,898 | ID | 0,88 | 0,977 | 0,919 | 0,941 | 0,941 | 0,854 | 0,922 | 0,925 | 0,88 | 0,87 | 0,87 | 0,922 | 0,922 |
| GU199195 | 0,881 | 0,914 | 0,87 | 0,868 | 0,865 | 0,875 | 0,822 | ID | 0,896 | 0,932 | 0,935 | 0,935 | 0,925 | 0,928 | 0,932 | 0,954 | 0,954 | 0,954 | 0,928 | 0,928 |
| EF990696 | 0,865 | 0,857 | 0,854 | 0,844 | 0,866 | 0,927 | 0,966 | 0,846 | ID | 0,938 | 0,961 | 0,961 | 0,873 | 0,941 | 0,944 | 0,899 | 0,889 | 0,889 | 0,941 | 0,941 |
| GU199517 | 0,899 | 0,883 | 0,89 | 0,889 | 0,904 | 0,938 | 0,868 | 0,872 | 0,895 | ID | 0,977 | 0,977 | 0,912 | 0,974 | 0,977 | 0,935 | 0,925 | 0,925 | 0,974 | 0,974 |
| DQ494401 | 0,9 | 0,886 | 0,886 | 0,884 | 0,897 | 0,974 | 0,92 | 0,88 | 0,949 | 0,934 | ID | 1 | 0,912 | 0,98 | 0,983 | 0,935 | 0,928 | 0,928 | 0,98 | 0,98 |
| DQ494402 | 0,9 | 0,886 | 0,886 | 0,884 | 0,897 | 0,974 | 0,92 | 0,88 | 0,949 | 0,934 | 1 | ID | 0,912 | 0,98 | 0,983 | 0,935 | 0,928 | 0,928 | 0,98 | 0,98 |
| GU827413 | 0,858 | 0,911 | 0,863 | 0,857 | 0,867 | 0,858 | 0,812 | 0,878 | 0,834 | 0,857 | 0,855 | 0,855 | ID | 0,899 | 0,902 | 0,944 | 0,938 | 0,938 | 0,899 | 0,899 |
| SWRV1 | 0,893 | 0,869 | 0,881 | 0,883 | 0,892 | 0,931 | 0,873 | 0,865 | 0,895 | 0,953 | 0,931 | 0,931 | 0,849 | ID | 0,996 | 0,928 | 0,922 | 0,922 | 0,987 | 0,987 |
| SWRV2 | 0,894 | 0,872 | 0,884 | 0,884 | 0,893 | 0,934 | 0,877 | 0,866 | 0,898 | 0,954 | 0,934 | 0,934 | 0,848 | 0,996 | ID | 0,932 | 0,925 | 0,925 | 0,99 | 0,99 |
| SWRV3 | 0,886 | 0,951 | 0,887 | 0,878 | 0,877 | 0,891 | 0,832 | 0,911 | 0,859 | 0,88 | 0,885 | 0,885 | 0,906 | 0,875 | 0,878 | ID | 0,967 | 0,967 | 0,922 | 0,922 |
| SWRV4 | 0,885 | 0,94 | 0,875 | 0,873 | 0,873 | 0,879 | 0,817 | 0,907 | 0,843 | 0,868 | 0,876 | 0,876 | 0,909 | 0,864 | 0,865 | 0,949 | ID | 1 | 0,915 | 0,915 |
| SWRV5 | 0,885 | 0,94 | 0,875 | 0,873 | 0,873 | 0,879 | 0,817 | 0,907 | 0,843 | 0,868 | 0,876 | 0,876 | 0,909 | 0,864 | 0,865 | 0,949 | 1 | ID | 0,915 | 0,915 |
| SWRV6 | 0,901 | 0,877 | 0,887 | 0,886 | 0,895 | 0,946 | 0,869 | 0,879 | 0,897 | 0,947 | 0,935 | 0,935 | 0,854 | 0,956 | 0,957 | 0,88 | 0,885 | 0,885 | ID | 1 |
| SWRV7 | 0,901 | 0,879 | 0,89 | 0,889 | 0,895 | 0,946 | 0,869 | 0,877 | 0,897 | 0,949 | 0,935 | 0,935 | 0,856 | 0,959 | 0,96 | 0,882 | 0,883 | 0,883 | 0,995 | ID |

Apêndice E – Valores de similaridade nucleotídica e de aminoácidos da região consensual das sequências de rotavírus geradas neste estudo (SWRV1 a SWRV7) frente às demais representativas do genotipo N1 de NSP2 depositadas no GenBank. As áreas em branco representam as identidades nucleotídicas, e as cinzas, as identidades de aminoácidos - São Paulo - 2013

APÊNDICE F

| | GU199491 | EF990690 | DQ916134 | EF990698 | DQ204739 | EF672618 | EF672590 | DQ146698 | EF560712 | DQ146681 | SWRV1 | SWRV2 | SWRV3 | SWRV4 | SWRV5 | SWRV6 |
|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| GU199491 | ID | 0,917 | 1 | 0,932 | 0,989 | 0,979 | 0,948 | 0,969 | 0,989 | 0,989 | 0,979 | 0,979 | 0,979 | 0,994 | 0,994 | 0,994 |
| EF990690 | 0,909 | ID | 0,917 | 0,984 | 0,907 | 0,896 | 0,881 | 0,886 | 0,907 | 0,907 | 0,907 | 0,907 | 0,907 | 0,912 | 0,912 | 0,922 |
| DQ916134 | 0,979 | 0,914 | ID | 0,932 | 0,989 | 0,979 | 0,948 | 0,969 | 0,989 | 0,989 | 0,979 | 0,979 | 0,979 | 0,994 | 0,994 | 0,994 |
| EF990698 | 0,924 | 0,976 | 0,929 | ID | 0,922 | 0,912 | 0,896 | 0,902 | 0,922 | 0,922 | 0,922 | 0,922 | 0,922 | 0,927 | 0,927 | 0,938 |
| DQ204739 | 0,978 | 0,904 | 0,978 | 0,919 | ID | 0,969 | 0,938 | 0,969 | 0,979 | 0,979 | 0,969 | 0,969 | 0,969 | 0,984 | 0,984 | 0,984 |
| EF672618 | 0,969 | 0,898 | 0,966 | 0,91 | 0,968 | ID | 0,943 | 0,958 | 0,979 | 0,979 | 0,958 | 0,958 | 0,958 | 0,974 | 0,974 | 0,974 |
| EF672590 | 0,936 | 0,872 | 0,936 | 0,887 | 0,937 | 0,941 | ID | 0,922 | 0,943 | 0,943 | 0,943 | 0,943 | 0,943 | 0,943 | 0,943 | 0,953 |
| DQ146698 | 0,968 | 0,9 | 0,964 | 0,909 | 0,973 | 0,974 | 0,936 | ID | 0,979 | 0,979 | 0,948 | 0,948 | 0,948 | 0,963 | 0,963 | 0,963 |
| EF560712 | 0,976 | 0,905 | 0,973 | 0,917 | 0,974 | 0,986 | 0,944 | 0,984 | ID | 1 | 0,969 | 0,969 | 0,969 | 0,984 | 0,984 | 0,984 |
| DQ146681 | 0,973 | 0,907 | 0,973 | 0,919 | 0,971 | 0,983 | 0,947 | 0,981 | 0,993 | ID | 0,969 | 0,969 | 0,969 | 0,984 | 0,984 | 0,984 |
| SWRV1 | 0,949 | 0,882 | 0,949 | 0,898 | 0,954 | 0,942 | 0,941 | 0,944 | 0,952 | 0,949 | ID | 1 | 1 | 0,974 | 0,974 | 0,979 |
| SWRV2 | 0,949 | 0,882 | 0,949 | 0,898 | 0,954 | 0,942 | 0,941 | 0,944 | 0,952 | 0,949 | 1 | ID | 1 | 0,974 | 0,974 | 0,979 |
| SWRV3 | 0,954 | 0,887 | 0,954 | 0,902 | 0,959 | 0,947 | 0,946 | 0,949 | 0,957 | 0,954 | 0,991 | 0,991 | ID | 0,974 | 0,974 | 0,979 |
| SWRV4 | 0,971 | 0,895 | 0,968 | 0,91 | 0,969 | 0,959 | 0,936 | 0,962 | 0,966 | 0,962 | 0,956 | 0,956 | 0,961 | ID | 1 | 0,989 |
| SWRV5 | 0,971 | 0,895 | 0,968 | 0,91 | 0,969 | 0,959 | 0,936 | 0,962 | 0,966 | 0,962 | 0,956 | 0,956 | 0,961 | 1 | ID | 0,989 |
| SWRV6 | 0,971 | 0,904 | 0,968 | 0,922 | 0,966 | 0,961 | 0,937 | 0,956 | 0,968 | 0,964 | 0,951 | 0,951 | 0,952 | 0,974 | 0,974 | ID |

Apêndice F – Valores de similaridade nucleotídica e de aminoácidos da região consensual das sequências de rotavírus geradas neste estudo (SWRV1 a SWRV6) frente às demais representativas do genotipo H1 de NSP5 depositadas no GenBank. As áreas em branco representam as identidades nucleotídicas, e as cinzas, as identidades de aminoácidos - São Paulo - 2013

APÊNDICE G

Apêndice A – Valores de similaridade nucleotídica e de aminoácidos da região consensual das sequências de rotavírus geradas neste estudo (SWRV1 a SWRV6) frente às demais representativas de NSP6 depositadas no GenBank. As áreas em branco representam as identidades nucleotídicas, e as cinzas, as identidades de aminoácidos - São Paulo - 2013

| | DQ916134 | JF796722 | JF796700 | HM773820 | HM773798 | HM773776 | HM773710 | AY769694 | EF185863 | DQ838628 | JF791805 | SWRV1 | SWRV2 | SWRV3 | SWRV4 | SWRV5 | SWRV6 |
|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| DQ916134 | ID | 0,978 | 0,967 | 0,902 | 0,902 | 0,902 | 0,934 | 0,804 | 0,804 | 0,923 | 0,913 | 0,945 | 0,945 | 0,945 | 0,967 | 0,967 | 0,978 |
| JF796722 | 0,982 | ID | 0,989 | 0,902 | 0,902 | 0,902 | 0,934 | 0,804 | 0,804 | 0,902 | 0,891 | 0,945 | 0,945 | 0,945 | 0,989 | 0,989 | 1 |
| JF796700 | 0,982 | 0,992 | ID | 0,891 | 0,891 | 0,891 | 0,923 | 0,793 | 0,793 | 0,891 | 0,88 | 0,934 | 0,934 | 0,934 | 0,978 | 0,978 | 0,989 |
| HM773820 | 0,946 | 0,935 | 0,935 | ID | 1 | 1 | 0,88 | 0,793 | 0,793 | 0,891 | 0,88 | 0,956 | 0,956 | 0,956 | 0,891 | 0,891 | 0,902 |
| HM773798 | 0,946 | 0,935 | 0,935 | 1 | ID | 1 | 0,88 | 0,793 | 0,793 | 0,891 | 0,88 | 0,956 | 0,956 | 0,956 | 0,891 | 0,891 | 0,902 |
| HM773776 | 0,946 | 0,935 | 0,935 | 1 | 1 | ID | 0,88 | 0,793 | 0,793 | 0,891 | 0,88 | 0,956 | 0,956 | 0,956 | 0,891 | 0,891 | 0,902 |
| HM773710 | 0,978 | 0,967 | 0,967 | 0,942 | 0,942 | 0,942 | ID | 0,826 | 0,826 | 0,902 | 0,891 | 0,923 | 0,923 | 0,923 | 0,923 | 0,923 | 0,934 |
| AY769694 | 0,913 | 0,903 | 0,903 | 0,903 | 0,903 | 0,903 | 0,924 | ID | 1 | 0,815 | 0,804 | 0,836 | 0,836 | 0,836 | 0,793 | 0,793 | 0,804 |
| EF185863 | 0,913 | 0,903 | 0,903 | 0,903 | 0,903 | 0,903 | 0,924 | 1 | ID | 0,815 | 0,804 | 0,836 | 0,836 | 0,836 | 0,793 | 0,793 | 0,804 |
| DQ838628 | 0,964 | 0,946 | 0,946 | 0,939 | 0,939 | 0,939 | 0,956 | 0,921 | 0,921 | ID | 0,989 | 0,913 | 0,913 | 0,913 | 0,891 | 0,891 | 0,902 |
| JF791805 | 0,96 | 0,942 | 0,942 | 0,935 | 0,935 | 0,935 | 0,953 | 0,917 | 0,917 | 0,996 | ID | 0,902 | 0,902 | 0,902 | 0,88 | 0,88 | 0,891 |
| SWRV1 | 0,974 | 0,964 | 0,964 | 0,971 | 0,971 | 0,971 | 0,967 | 0,924 | 0,924 | 0,96 | 0,956 | ID | 1 | 1 | 0,934 | 0,934 | 0,945 |
| SWRV2 | 0,974 | 0,964 | 0,964 | 0,971 | 0,971 | 0,971 | 0,967 | 0,924 | 0,924 | 0,96 | 0,956 | 1 | ID | 1 | 0,934 | 0,934 | 0,945 |
| SWRV3 | 0,974 | 0,964 | 0,964 | 0,971 | 0,971 | 0,971 | 0,967 | 0,924 | 0,924 | 0,96 | 0,956 | 1 | 1 | ID | 0,934 | 0,934 | 0,945 |
| SWRV4 | 0,985 | 0,982 | 0,982 | 0,946 | 0,946 | 0,946 | 0,971 | 0,913 | 0,913 | 0,956 | 0,953 | 0,974 | 0,974 | 0,974 | ID | 1 | 0,989 |
| SWRV5 | 0,985 | 0,982 | 0,982 | 0,946 | 0,946 | 0,946 | 0,971 | 0,913 | 0,913 | 0,956 | 0,953 | 0,974 | 0,974 | 0,974 | 1 | ID | 0,989 |
| SWRV6 | 0,985 | 0,989 | 0,989 | 0,946 | 0,946 | 0,946 | 0,971 | 0,913 | 0,913 | 0,956 | 0,953 | 0,974 | 0,974 | 0,974 | 0,992 | 0,992 | ID |