PALOMA DE OLIVEIRA TONIETTI

Ocorrência e caracterização molecular de vírus associados às
enteropatias em suínos no Estado de São Paulo

São Paulo
2013

PALOMA DE OLIVEIRA TONIETTI

**Ocorrência e caracterização molecular de vírus associados às enteropatias em suínos no
Estado de São Paulo**

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. Fabio Gregori

São Paulo

2013

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.2754
FMVZ

Tonietti, Paloma De Oliveira
Ocorrência e caracterização molecular de vírus associados às enteropatias em suínos no Estado de
São Paulo / Paloma De Oliveira Tonietti. -- 2013.
190 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. Fabio Gregori.

1. Rotavírus. 2. Coronavírus. 3. Suinocultura. 4. Medicina veterinária preventiva. 5. PCR. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Ocorrência e caracterização molecular de vírus associados às enteropatias em suínos no estado de São Paulo", protocolado sob o nº 2053/2010, utilizando amostras fecais de 230 (duzentos e trinta) amostras fecais de suíno, 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 "Occurrence and molecular characterization of porcine enteropathy-associated viruses in São Paulo State", protocol number 2053/2010, utilizing 230 (two hundred thirty) 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, 29 de outubro de 2012

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: TONIETTI, Paloma de Oliveira

Título: Ocorrência e caracterização molecular de vírus associados às enteropatias em suínos no Estado de São Paulo

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

Data: __/__/__

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Amauri Toniatti e Roseli de Oliveira Toniatti

*Aos meus avós, Maurílio Toniatti e Eunice Gonçalves Toniatti, e Luiz Antônio de Carvalho e
Delfina Afonso de Carvalho (in memoriam)*

À querida Rebeca (in memoriam)

EPÍGRAFE

**“Viva como se fosse morrer amanhã.
Aprenda como se fosse viver para sempre”**

Mahatma Ghandi

AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar meus caminhos e sempre me fortalecer em todos os momentos de minha vida.

Aos meus queridos pais, Amauri Toniatti e Roseli de Oliveira Toniatti, pela amizade, apoio, carinho em todas as fases da minha vida e principalmente pelo exemplo de dignidade e respeito.

Ao Prof. Dr. Fabio Gregori, pela orientação, oportunidade de crescimento, confiança, amizade, conselhos, e grandes ensinamentos, proporcionando a execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Paulo Eduardo Brandão, pelos conselhos, sugestões e amizade.

A todos os demais professores do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS), pelos momentos agradáveis.

Às queridas amigas da pós-graduação, Aline Santana da Hora, Carolina Torres Alejo, Fernanda Dornellas Florentino da Silva, Karen Linares Ferrari, Karen Miyuki Asano, Juliana Silva Nogueira, Patrícia Rossi Moriconi, pela paciência em todos os momentos, conselhos, sugestões, incentivos, e sobretudo pela amizade.

À Juliana Galera Castilho, pesquisadora do Instituto Pasteur e amiga da pós-graduação, por todo apoio, amizade, incentivo e conselhos.

À Sheila Oliveira Souza Silva, pela amizade, dedicação e apoio técnico neste trabalho.

Aos funcionários e amigos do VPS, Pedro, Renato, Danival Moreira, Maria Cristina Paick, Ana Virgínia Prado, Gisele de Oliveira, Alexandre Sanches, Sandra Sanches e aos demais, pela agradável convivência, incentivo, momentos de risada e descontração.

Ao Enio Mori, pesquisador do Instituto Pasteur e amigo da pós-graduação, por todo apoio, sugestões e oportunidade de aprendizado.

A todos os funcionários da Biblioteca Virginie Buff D'Ápice pela dedicação e revisão da dissertação.

À Prof^a Dr^a Tereza Cristina Cardoso, por todo conhecimento repassado, oportunidades, por ter contribuído na minha formação profissional, pelo apoio e amizade.

À Hilka Fátima Frison Mendes Neves e Juliana Tessália Wagatsuma, queridas amigas da graduação, por todos os momentos de amizade, apoio e incentivo.

À Josete Garcia Bersano, Diretora Técnica do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento em Sanidade Animal, ao Renato A. Ogata, Técnico de Laboratório do Instituto Biológico, e à Prof^a Dr^a Vera Letticie de Azevedo Ruiz pela doação das amostras e por permitirem parte da execução prática deste trabalho no Laboratório de Doenças de Suínos "WASHINGTON SUGAY".

À Simone Miyashiro, pesquisadora do Instituto Biológico, e à Samantha Ive Miyashiro, especialista de laboratório da Universidade de São Paulo (USP), pela ajuda no transporte das amostras, apoio e amizade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro, com a bolsa de auxílio pesquisa concedida (nº do processo: 478756/2010-0).

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro, com a bolsa regular de mestrado concedida (nº do processo: 2011/01563-3).

A todos aqueles que de maneira direta ou indireta participaram da minha formação profissional e permitiram que este estudo fosse realizado, meus sinceros agradecimentos.

Agradecimento ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

pelo apoio financeiro junto ao projeto de pesquisa nº 478756/2010-0

Agradecimento à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)

pelo apoio financeiro com a bolsa regular de mestrado concedida

(nº do processo: 2011/01563-3).

RESUMO

TONIETTI, P. O. **Ocorrência e caracterização molecular de vírus associados às enteropatias em suínos no Estado de São Paulo.** [Occurrence and molecular characterization of porcine enteropathy-associated viruses in Sao Paulo State.]. 2013. 190 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Os rotavírus e coronavírus são importantes agentes virais associados às enteropatias em suínos, tendo implicações em Saúde Animal, Saúde Pública e no Agronegócio. Apesar disso, são escassos os trabalhos em nosso meio que visaram detectá-los e caracterizá-los com maior amplitude, especialmente os coronavírus. Nesse sentido, determinou-se a ocorrência das amostras circulantes destes vírus a partir de materiais clínicos oriundos de diversas granjas produtoras de suínos de 12 diferentes municípios do Estado de São Paulo, mediante o emprego de três reações, previamente descritas, em paralelo: uma *multiplex nested* RT-PCR para detecção simultânea de dois coronavírus suínos que podem ser encontrados nas fezes desses animais, o Vírus da Gastroenterite Transmissível (TGEV) e o Vírus da Diarreia Epidêmica dos Suínos (PEDV), e rotavírus do grupo A; uma *nested* RT-PCR para investigar a existência de algum pancoronavírus nos animais pesquisados; e uma RT-PCR para verificar a ocorrência do TGEV e do Coronavírus Respiratório Suíno (PRCoV), o qual também pode ser observado em materiais fecais de porcos. Para a primeira reação, foram utilizados dois pares de *primers* dirigidos ao gene S do TGEV (951pb e 793pb), dois ao gene M de PEDV (425pb e 291pb), e dois ao gene NSP5 do rotavírus (317pb e 208pb); para a segunda, foram empregados quatro *primers* direcionados ao gene RdRp dos coronavírus (251pb e 136pb); e para a terceira, foi usado um par de *primers* tendo como alvo o gene S (886pb para TGEV e 205 a 214pb para PRCoV). Os dados obtidos demonstraram que há uma elevada frequência de ocorrência de rotavírus nas criações comerciais, acometendo 40,37% do total de amostras testadas (88/218) e 91,6% dos municípios amostrados (11/12 municípios). Os coronavírus não foram detectados nas criações. Os fragmentos de rotavírus amplificados provenientes da *multiplex nested* RT-PCR foram purificados e caracterizados através da determinação das

sequências de nucleotídeos, referentes aos genes VP4 e VP7. Foi possível o sequenciamento nucleotídico total do gene VP7 de uma amostra, e o sequenciamento parcial de 34 (aproximadamente 24,74% a 35,57% da região codificadora) e 23 (aproximadamente 63,19% a 98,77% da região codificadora) amostras para o gene VP4 e VP7, respectivamente. Quanto aos genótipos, foram detectados o G3, G5 e G9 em combinação com P[6], P[13] (e/ou P[22]) e P[23]. Formulações vacinais disponíveis comercialmente contemplam apenas os genótipos G4 e G5 dos rotavírus, o que demonstra uma desvantagem em termos de proteção de animais suscetíveis, visto que somente um deles (G5) foi encontrado nos animais analisados no presente estudo. O conhecimento deste vírus permite estudos quanto à transmissão zoonótica e interespecies deste micro-organismo e o fortalecimento do controle e de medidas profiláticas direcionadas ao agente.

Palavras-chave: Rotavírus. Coronavírus. Suinocultura. Medicina Veterinária Preventiva. PCR.

ABSTRACT

TONIETTI, P. O. **Occurrence and molecular characterization of porcine enteropathy-associated viruses in Sao Paulo State.** [Ocorrência e caracterização molecular de vírus associados às enteropatias em suínos no Estado de São Paulo.]. 2013. 190 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

The rotavirus and coronavirus are important viral agents associated with enteropathies in pigs, with implications for Animal Health, Public Health and Agribusiness. Nevertheless, there is little data about the detection and characterization of these viruses, especially the coronavirus. This study determined the occurrence of them on farrow-to-finish pig farms from 12 different cities in the São Paulo State, Brazil. For this purpose, three reactions, previously described, were performed: multiplex nested RT-PCR for simultaneous detection of two porcine coronavirus that can be found in the feces of these animals, the Transmissible Gastroenteritis Virus (TGEV) and the Porcine Epidemic Diarrhea Virus (PEDV), and group A rotavirus; a nested RT-PCR to investigate the occurrence of any member of the genus *Coronavirus*; and a RT-PCR for detection of the TGEV and Porcine Respiratory Coronavirus (PRCoV), which can also be observed in fecal samples of swine. For the first reaction, we used two pairs of primers targeting the S gene of TGEV (951bp and 793bp), two primers targeting to the M gene of PEDV (425bp and 291bp), and two primers targeting the NSP5 gene of group A rotavirus (317bp and 208bp). For the second reaction, four primers were used targeting to the RdRp gene of coronaviruses (251bp and 136bp). In the third reaction, a pair of primers was used targeting the S gene (886bp to TGEV and 205-214bp to PRCoV). This data showed that 40.37% of the total samples tested (88/218) and 91.6% of the cities (11/12 cities) were positive for rotavirus. Coronaviruses were not detected on farms examined in this study. The rotavirus positive stools were characterized based on PCR and nucleotide sequence analyses for the VP4 and VP7 genes. The VP7 complete nucleotide sequencing was obtained for one sample, and partial nucleotide sequencing for 34 (about 24.74% to 35.57% of coding region) and 23 (about 63.19% to 98.77% of coding region) samples for the VP4 and VP7 gene,

respectively. The genotypes G3, G5 and G9 in combination with P[6], P[13] (and / or P[22]) and P[23] was found. Commercially available vaccine formulations include only the G4 and G5 rotavirus genotypes, which demonstrates a disadvantage in terms of protection of susceptible animals, whereas only one (G5) was detected in the animals analyzed in this study. The knowledge of this virus allows studies of the zoonotic and interspecies transmission of this microorganism and the strengthening of control and prophylactic measures directed to the agent.

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

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1 -	Representação esquemática do genoma dos rotavírus de acordo com os seus 11 segmentos. O décimo primeiro segmento genômico está em destaque (flecha).	36
Figura 2 -	Representação esquemática da VP4 de rotavírus. Estão indicados os sítios de ligação do ácido siálico e dos anticorpos monoclonais 7A12 e 2G4 e o domínio de fusão	41
Figura 3 -	Representação esquemática da VP7 de rotavírus. Estão indicados os domínios hidrofóbicos, os sítios de ligação com o Ca^{2+} e os epítomos de neutralização	43
Figura 4 -	Ciclo de replicação do rotavírus	48
Figura 5 -	Modulação do sistema imune inato do hospedeiro contra o rotavírus.....	51
Figura 6 –	Genoma de quatro diferentes coronavírus	60
Figura 7 -	Representação esquemática do SARS-CoV, demonstrando as 16 proteínas não estruturais da ORF1 (regiões em cinza claro)	62
Figura 8 -	Ciclo de replicação dos coronavírus	64
Figura 9 -	A flecha de cor vermelha aponta para a região de deleção do PRCoV em relação ao TGEV.....	67
Figura 10 -	Ilustração da análise dos <i>primers</i> descritos por Iturriza-Gómara et al. (2002) acerca do gene VP6 do rotavírus do grupo A. Os retângulos pretos representam a área de anelamento dos <i>primers</i> senso (VP6F) e antisenso (VP6R)	75
Figura 11 -	Ilustração da análise dos <i>primers</i> descritos por Salem et al. (2010) acerca do gene NSP5 do rotavírus do grupo A. Os retângulos pretos representam os <i>primers</i> senso (P1) e antisenso (P2) da PCR; e os vermelhos demonstram os <i>primers</i> senso (P3) e antisenso (P4) da <i>nested</i> PCR.....	76

Figura 12 -	Ilustração da análise dos <i>primers</i> descritos por Salem et al. (2010) acerca do gene M do PEDV. Os retângulos pretos representam os <i>primers</i> senso (M1) e antisenso (M2) da PCR; e os vermelhos demonstram os <i>primers</i> senso (M3) e antisenso (M4) da <i>nested</i> PCR.....	78
Figura 13-	Ilustração da análise dos <i>primers</i> acerca do gene S do TGEV e PRCoV. O retângulo vermelho representa o <i>primer</i> senso (S3) da <i>nested</i> PCR descrito por Salem et al. (2010); e o verde o <i>primer</i> senso (F1121) descrito por Paton et al. (1997).	79
Figura 14 -	Ilustração da análise dos <i>primers</i> acerca do gene S do TGEV e PRCoV. O retângulo preto representa o <i>primer</i> antisenso (S2) da PCR; o vermelho o <i>primer</i> antisenso (S4) da <i>nested</i> PCR descritos por Salem et al. (2010); e o verde o <i>primer</i> antisenso (R1122) descrito por Paton et al. (1997).	80
Figura 15 -	Ilustração da análise dos <i>primers</i> acerca do gene direcionado à ORF1b. Os retângulos pretos representam os <i>primers</i> senso (2Bp) e antisenso (4Bm) descritos por Stephensen, Casebolt e Gangopadhyay (1999); e os vermelhos demonstram os <i>primers</i> senso (CV2U) e antisenso (CV2L) descritos por Brandão et al. (2005)	81
Figura 16 -	Esquema de diagnóstico para rotavírus e coronavírus suínos empregados no presente estudo.....	85
Figura 17 -	Representação esquemática da estrutura genômica de um Alphacoronavírus.....	86
Figura 18 -	Representação esquemática das regiões de anelamento dos <i>primers</i> acerca dos genes codificadores da VP4 e VP7	90
Figura 19 -	Alinhamento de um fragmento parcial de 223 aminoácidos traduzidos a partir do gene codificador da proteína VP7 de rotavírus suínos. O retângulo em vermelho representa 16,67% dos domínios hidrofóbicos da proteína	104
Figura 20 -	Alinhamento de um fragmento parcial de 191 aminoácidos traduzidos a partir do gene codificador da proteína VP7 de rotavírus suínos. O retângulo em vermelho representa 62,5% dos domínios hidrofóbicos da proteína	106
Figura 21 -	Alinhamento de um fragmento parcial de 263 aminoácidos traduzidos a partir do gene codificador da proteína VP7 de rotavírus suínos. O retângulo em vermelho representa 68,75% dos domínios hidrofóbicos da proteína	108
Figura 22 -	Alinhamento de um fragmento parcial de 233 aminoácidos traduzidos a partir do gene codificador da proteína VP4 de rotavírus suínos. A região entre os colchetes corresponde ao sítio de ligação do ácido siálico	110

Figura 23 -	Alinhamento de um fragmento parcial de 181 aminoácidos traduzidos a partir do gene codificador da proteína VP4 de rotavírus suínos. A região entre os colchetes corresponde ao sítio de ligação do ácido siálico	112
Figura 24 -	Alinhamento de um fragmento parcial de 169 aminoácidos traduzidos a partir do gene codificador da proteína VP4 de rotavírus suínos. A região entre os colchetes corresponde ao sítio de ligação do ácido siálico	116
Figura 25 -	Alinhamento de um bloco consensual de 166 aminoácidos traduzidos a partir do gene codificador da proteína VP7 das sequências parciais de rotavírus suínos gerados no presente estudo. O retângulo em vermelho representa 16,67% dos domínios hidrofóbicos da proteína	118
Figura 26 -	Alinhamento do bloco consensual de 159 aminoácidos traduzidos a partir do gene codificador da proteína VP4 das sequências parciais de rotavírus suínos gerados no presente estudo. Os retângulos em preto representam regiões de inserção ou deleção de aminoácidos. A região entre os colchetes corresponde ao sítio de ligação do ácido siálico	119
Figura 27 -	Árvore filogenética construída com o método de <i>neighbor-joining</i> através do modelo de substituição <i>maximum composite likelihood</i> (Software Mega v. 5) para a região parcial (543 nucleotídeos) do gene codificador da proteína VP7 dos rotavírus. As amostras apresentam a identificação accession number/ amostra / hospedeiro. Os números próximos a cada nó representam os valores de 1000 repetições de “ <i>bootstrap</i> ”, tendo sido demonstrados apenas aqueles superiores a 50%. A escala representa o número de substituições/sítio. As amostras deste estudo estão precedidas por um quadrado preto	121
Figura 28 -	Árvore filogenética construída com o método de <i>neighbor-joining</i> através do modelo de substituição <i>maximum composite likelihood</i> (Software Mega v. 5) para a região parcial (493 nucleotídeos) do gene codificador da proteína VP4 dos rotavírus. As amostras apresentam a identificação accession number/ amostra / hospedeiro. Os números próximos a cada nó representam os valores de 1000 repetições de “ <i>bootstrap</i> ”, tendo sido demonstrados apenas aqueles superiores a 50%. A escala representa o número de substituições/sítio. As amostras deste estudo estão precedidas por um losango preto	122

LISTA DE MAPA

Mapa 1 -	Origem das amostras fecais de suínos provenientes do Estado de São Paulo	72
----------	--	----

LISTA DE GRÁFICO

Gráfico 1 -	Amostras positivas para rotavírus e total de amostras testadas nos diferentes municípios do Estado de São Paulo – São Paulo - 2013.....	102
-------------	---	-----

LISTAS DE QUADROS

Quadro 1 -	Gene, valores do “ <i>cut-off</i> ” da porcentagem de identidade da ORF, quantidade de genótipos e origem da denominação destes.....	39
Quadro 2 -	Descrição dos <i>primers</i> analisados no presente estudo: organismo, <i>primer</i> , sequência (5'→3'), comprimento do produto (pb), posição no genoma, referência utilizada.....	73
Quadro 3 -	Descrição do comprimento do gene alvo dos organismos pesquisados no presente estudo.....	82
Quadro 4 -	Descrição dos <i>primers</i> utilizados para sequenciamento e genotipagem dos rotavírus: <i>primer</i> , sequência (5'→3'), tamanho do produto (pb), referência utilizada.....	91
Quadro 5 -	Valores de similaridade máxima e mínima de nucleotídeos e de aminoácidos da região consensual das sequências de rotavírus geradas neste estudo, bem como frente às demais representativas do genótipo G3 de VP7 depositadas no <i>Genbank</i> - São Paulo - 2013.....	105
Quadro 6 -	Valores de similaridade máxima e mínima de nucleotídeos e de aminoácidos da região consensual das sequências de rotavírus geradas neste estudo, bem como frente às demais representativas do genótipo G5 de VP7 depositadas no <i>Genbank</i> - São Paulo - 2013.....	107
Quadro 7 -	Valores de similaridade máxima e mínima de nucleotídeos e de aminoácidos da região consensual das sequências de rotavírus geradas neste estudo, bem como frente às demais representativas do genótipo G9 de VP7 depositadas no <i>Genbank</i> - São Paulo - 2013.....	109
Quadro 8 -	Valores de similaridade máxima e mínima de nucleotídeos e de aminoácidos da região consensual das sequências de rotavírus geradas neste estudo, bem como frente às demais representativas do genótipo P[6] de VP4 depositadas no <i>Genbank</i> - São Paulo - 2013.....	111
Quadro 9 -	Valores de similaridade máxima e mínima de nucleotídeos e de aminoácidos da região consensual das sequências de rotavírus geradas neste estudo, bem como frente às demais representativas do genótipo P[13] (e/ou P[22]) de VP4 depositadas no <i>Genbank</i> - São Paulo - 2013	113
Quadro 10 -	Valores de similaridade máxima e mínima de nucleotídeos e de aminoácidos da região consensual das sequências de rotavírus geradas neste estudo, bem como frente às demais representativas do genótipo P[23] de VP4 depositadas no <i>Genbank</i> - São Paulo - 2013.....	117

Quadro 11 -	Relação dos municípios de origem das amostras, respectivos genótipos G e tamanho do fragmento do gene sequenciado - São Paulo – 2013	123
Quadro 12 -	Relação dos municípios de origem das amostras, respectivos genótipos P e tamanho do fragmento do gene sequenciado - São Paulo - 2013	124
Quadro 13 -	Relação dos municípios de origem das amostras e respectivos genótipos P e G. São Paulo, 2013	126

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Sequências do gene VP7 de rotavírus, recuperadas do <i>Genbank</i> , utilizadas para a reconstrução da filogenia, segundo estirpe viral de rotavírus, <i>acession number</i> , genotipo, hospedeiro e referência - São Paulo - 2013	93
Tabela 2 -	Sequências do gene VP4 de rotavírus, recuperadas do <i>Genbank</i> , utilizadas para a reconstrução da filogenia, segundo estirpe viral de rotavírus, <i>acession number</i> , genotipo, hospedeiro e referência - São Paulo - 2013	96
Tabela 3 -	Razão entre o número de amostras positivas para rotavírus e o número de amostras testadas nos diferentes municípios do Estado de São Paulo - São Paulo - 2013	101

LISTA DE APÊNDICES

- Apêndice A - Matriz de identidade referente ao alinhamento de um fragmento parcial de 253 aminoácidos traduzidos a partir do gene codificador da proteína VP7 de rotavírus suínos. As áreas em branco representam as identidades nucleotídicas, e as cinzas, as identidades de aminoácidos..... 163
- Apêndice B - Matriz de identidade referente ao alinhamento de um fragmento parcial de 191 aminoácidos traduzidos a partir do gene codificador da proteína VP7 de rotavírus suínos. As áreas em branco representam as identidades nucleotídicas, e as cinzas, as identidades de aminoácidos..... 164
- Apêndice C - Matriz de identidade referente ao alinhamento de um fragmento parcial de 263 aminoácidos traduzidos a partir do gene codificador da proteína VP7 de rotavírus suínos. As áreas em branco representam as identidades nucleotídicas, e as cinzas, as identidades de aminoácidos..... 165
- Apêndice D - Matriz de identidade referente ao alinhamento de um fragmento parcial de 233 aminoácidos traduzidos a partir do gene codificador da proteína VP4 de rotavírus suínos. As áreas em branco representam as identidades nucleotídicas, e as cinzas, as identidades de aminoácidos..... 166
- Apêndice E - Matriz de identidade referente ao alinhamento de um fragmento parcial de 181 aminoácidos traduzidos a partir do gene codificador da proteína VP4 de rotavírus suínos. As áreas em branco representam as identidades nucleotídicas, e as cinzas, as identidades de aminoácidos..... 167
- Apêndice F - Matriz de identidade referente ao alinhamento de um fragmento parcial de 169 aminoácidos traduzidos a partir do gene codificador da proteína VP4 de rotavírus suínos. As áreas em branco representam as identidades nucleotídicas, e as cinzas, as identidades de aminoácidos..... 168

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2-O-MT	2-O-ribose metiltransferase
3CLpro	3C- <i>like</i> protease
A	adenina
ADP-ribose	adenosina difosfato ribose
APN	aminopeptidase N
BCoV	Coronavírus Bovino
BLAST	<i>Basic Local Aligment Search Tool</i>
Ca ²⁺	cálcio
CCD	Centros de Controle de Doenças
CCoV	Coronavírus Canino
cDNA	ácido desoxirribonucleico complementar
C	citossina
Cl ⁻	cloro
CPK	<i>porcine kidney cell</i>
dATP	desoxiadenosina trifosfato
dCTP	desoxicitidina trifosfato
DEPC	dietilpirocarbonato
dGTP	desoxiguanosina trifosfato
dNTP	desoxinucleotídeos trifosfatos
dNTPase	deoxinucleotídeos- trifosfatase
DPL	partículas de dupla camada
dsRNA	fitas duplas de ácido ribonucleico
DTT	dithiothreitol
dTTP	deoxitimidina trifosfato
eIF4G	fator de iniciação de tradução de eucariotos – 4 gama

ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
ERGIC	compartimento intermediário no retículo endoplasmático de Golgi
et al.	e colaboradores
Exon	exonuclease
FCoV	coronavírus felino
FDA	<i>United States Food and Drug Administration</i>
FIPV	Vírus da Peritonite Infecciosa Felina
g	gravidade
G	guanina
HCoV-229E	Coronavírus Humano-229E
HEV	Vírus da Encefalomielite Hemaglutinante dos Suínos
HmLu	células da linhagem pulmão de hamster
IBV	Vírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas
IgA	imunoglobulina A
IgG	imunoglobulina G
IL	interleucina
INF	interferon
IRF3	fator regulador de interferon 3
IRF9	fator regulador de interferon 9
ISG	gene estimulador de interferon
K ⁺	potássio
LLR	<i>Lanzhou Lamb Rotavirus</i>
MDA-5	gene 5 associado ao melanoma diferenciado
MEGA	<i>Molecular Evolutionary Genetics Analysis</i>
Mg ²⁺	magnésio
MGP	glicoproteína semelhante à mucina
MHV	Vírus da Hepatite dos Camundongos
mM	milimolar
M-MLV	<i>Moloney Murine Leukemia Virus</i>

mRNA	RNA mensageiro
N	<i>any base</i> (A/C/G/T)
Na ⁺	sódio
NaCl	cloreto de sódio
N7-MTase	N7-guanina-metiltransferase
NCDV	<i>Nebraska Calf Diarrhea Virus</i>
NDP	nucleosídeo difosfato quinase
NendoU	endoribonuclease
NF-κβ	fator de transcrição nuclear -κβ
ng	nanogramas
NSP	proteína não estrutural
nt	nucleotídeos
NTPase	nucleosídeo-trifosfatase
OIE	Organização Mundial de Saúde Animal
ORF	<i>open reading frame</i>
p/v	partes por volume
PABP	proteína de ligação da cauda “ <i>poly A</i> ”
PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida
pb	pares de bases
PCR	reação em cadeia da polimerase
PED	Diarreia Epidêmica dos Suínos
PEDV	Vírus da Diarreia Epidêmica dos Suínos
PK-15	<i>porcine kidney-15</i>
PKR	proteína quinase dependente de dupla fita de RNA
PL1pro	<i>papain-like</i> protease 1
PL2pro	<i>papain-like</i> protease 2
PNSS	Programa Nacional de Sanidade Suídea
<i>pol</i>	polimerase
PRCoV	Coronavírus Respiratório Suíno

q.s.p.	quantidade suficiente para
qPCR	reação em cadeia da polimerase quantitativa
R	<i>purine</i> (A/G)
RdRp	RNA polimerase RNA dependente
RE	retículo endoplasmático
RER	retículo endoplasmático rugoso
RIG-1	gene 1 induzido pelo ácido retinóico
RNA	ácido ribonucléico
RT	transcrição reversa
RTPase	ácido ribonucléico-trifosfatase
RT-PCR	transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase
SARS-CoV	Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Severa
SDAV	Vírus da Sialodacrioadenite dos Ratos
SG	subgrupos
SGLT1	transportadores de sódio e glicose 1
ssRNA	fitas simples de ácido ribonucléico
STAT1	transdutores de sinal e ativadores de transcrição 1
STAT2	transdutores de sinal e ativadores de transcrição 2
T	timina
TCoV	Coronavírus dos Perus
TGE	Gastroenterite Transmissível
TGEV	Vírus da Gastroenterite Transmissível
U	unidades
V	<i>not T</i> (A/C/G)
v/v	volume por volume
VP	proteína viral (proteína estrutural)
W	<i>weak</i> (A/T)
Y	<i>pyrimidine</i> (C/T)
μL	microlitros

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
°C	graus Celsius
®	marca registrada
™	<i>trademark</i>
α	alfa
β	beta
γ	gama

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	30
2	REVISÃO DA LITERATURA	32
2.1	ROTAVIROSES.....	32
2.1.1	<i>Características morfológicas</i>	<i>34</i>
2.1.2	<i>Ocorrência.....</i>	<i>37</i>
2.1.3	<i>Classificação dos rotavírus do grupo A</i>	<i>37</i>
2.1.4	<i>Rotavírus suínos</i>	<i>40</i>
2.1.5	<i>Proteínas estruturais do core (VP1, VP2 e VP3)</i>	<i>40</i>
2.1.6	<i>Proteínas estruturais do capsídeo interno e externo (VP4, VP6 e VP7).....</i>	<i>41</i>
2.1.7	<i>Proteínas não estruturais</i>	<i>43</i>
2.1.8	<i>Mecanismos de evolução dos rotavírus e transmissão interespecies.....</i>	<i>45</i>
2.1.9	<i>Replicação</i>	<i>46</i>
2.1.10	<i>Patogenia.....</i>	<i>48</i>
2.1.11	<i>Eventos Imunológicos.....</i>	<i>50</i>
2.1.12	<i>Vacinas</i>	<i>52</i>
2.2	CORONAVIROSES.....	54
2.2.1	<i>Coronavírus Suínos</i>	<i>54</i>
2.2.2	<i>Ocorrência.....</i>	<i>58</i>
2.2.3	<i>Características morfológicas</i>	<i>59</i>
2.2.4	<i>Replicação</i>	<i>63</i>
2.2.5	<i>Coronavírus mutantes</i>	<i>65</i>
2.2.6	<i>Patogenia.....</i>	<i>65</i>
2.2.7	<i>Eventos Imunológicos.....</i>	<i>68</i>
2.2.8	<i>Vacinas</i>	<i>68</i>

3	OBJETIVOS	70
4	MATERIAL E MÉTODOS	71
4.1	AMOSTRAS DE CAMPO E DE REFERÊNCIA	71
4.2	ANÁLISE <i>IN SILICO</i> DOS <i>PRIMERS</i>	72
4.3	PREPARO DAS AMOSTRAS	83
4.4	EXTRAÇÃO DE RNA.....	83
4.5	REAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO REVERSA (RT)	84
4.6	AMPLIFICAÇÃO DO cDNA PELA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)	85
4.7	CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS DE ROTAVÍRUS DETECTADAS	89
4.8	REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO NUCLEOTÍDICO.....	91
4.9	ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS	93
5	RESULTADOS	100
5.1	ANÁLISE <i>IN SILICO</i> DOS <i>PRIMERS</i>	100
5.2	DIAGNÓSTICO DE ROTAVÍRUS E CORONAVÍRUS EM AMOSTRAS FECAIS.....	101
5.3	REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO NUCLEOTÍDICO.....	102
5.4	ALINHAMENTOS E MATRIZES DE IDENTIDADE DAS SEQUÊNCIAS GERADAS	103
5.5	INFERÊNCIA FILOGENÉTICA A PARTIR DAS SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS	120
6	DISCUSSÃO	127
7	CONCLUSÕES.....	136
	REFERÊNCIAS	137
	APÊNDICE	163
	ANEXOS	169

1 INTRODUÇÃO

O rebanho de suínos no Brasil possuía 2,46 milhões de matrizes no ano de 2010. A produção total do país nesse mesmo ano foi de 34 milhões de cabeças e 3237 mil toneladas (equivalente às carcaças), sendo que destas, 317 mil toneladas pertenciam a granjas de subsistência, 2697 mil toneladas foram destinadas ao consumo interno, e 540 mil toneladas foram exportadas. O Estado de São Paulo responde por 7% da produção de carne suína do Brasil, sendo que possui 122.000 matrizes comerciais e, aproximadamente, 18.400 matrizes de subsistência (ABIEPCS, 2012a). Em junho de 2011, a Rússia, que até o momento era a principal importadora de carne suína do Brasil, suspendeu as importações deste produto, afirmando sobre a ausência de um protocolo de equivalência sanitária por parte do mercado brasileiro. Em fevereiro de 2012, a China (maior mercado mundial consumidor) entrou pela primeira vez na lista de países importadores de carne suína do Brasil, enquanto que a Argentina restringiu as compras deste produto brasileiro. Apesar dos embargos russo e argentino, houve um aumento de 2,5% na produção do rebanho suíno em 2012, quando comparada ao ano de 2011. O consumo da carne suína no mercado interno se manteve em aproximadamente 2,8 milhões de toneladas, enquanto que as exportações deste produto ficaram em torno de 580 mil toneladas, abaixo do patamar alcançado pelo Brasil em 2007, de 607 mil toneladas (ABIEPCS, 2012b).

Nesse contexto a suinocultura brasileira desempenha um importante papel no agronegócio nacional. Esta cadeia produtiva é um importante fator de desenvolvimento econômico, pois provoca efeitos multiplicadores de renda e empregos diretos e indiretos em diferentes setores da economia (SALGADO; REIS; FIALHO, 2003).

As enterites virais, apesar de serem muito frequentes na produção de suínos, ainda não estão contempladas dentro do Programa Nacional de Sanidade Suídea (PNSS), lançado em 2004 pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil (BRASIL, 2004). Nas criações animais, os patógenos entéricos consistem num complexo desafio quanto ao seu controle e prevenção não só pela carência diagnóstica em grande parte dos episódios (BERN; GLASS, 1994), mas por contar com diferentes causas associadas, entre elas nutricionais, fisiológicas, ambientais, infecciosas, entre outras, atuando simultaneamente. Em se tratando

da produção animal, isto reflete em prejuízos principalmente nas fases iniciais de vida, um período crítico na sobrevivência e desenvolvimento dos animais (MORÉS; AMARAL, 2001).

Dentre os principais agentes envolvidos nas infecções entéricas em diferentes países, estão os coronavírus e rotavírus (SALEM et al., 2010). Ao considerarmos que as enterites virais representam um fator negativo para a produção de alimentos de origem animal, aliado ao fato de que no Brasil são escassos os trabalhos que visam à caracterização mais aprofundada destes agentes em suínos, justifica-se a proposta deste trabalho na necessidade de estudá-los e dessa maneira gerar conhecimentos acerca da cadeia epidemiológica das enteropatias suínas, principalmente no tocante ao delineamento de medidas profiláticas mais efetivas, de ações de vigilância, e informações acerca de suas relações com outras espécies animais.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Aqui será apresentada uma compilação com base em literaturas já existentes sobre as rotaviroses e coronaviroses.

2.1 ROTAVIROSES

Os rotavírus têm sido incriminados como a maior causa de gastroenterite aguda com consequente morbi-mortalidade, acometendo crianças e jovens em escala universal (PARASHAR, 2003). Eles são classificados em 7 grupos antigenicamente distintos (A-G) (CIARLET; ESTES, 2002). Recentemente, um novo grupo H está sendo atribuído a um vírus denominado “*new adult diarrhea rotavirus*”, o qual foi isolado de suínos (MATTHIJNSSENS et al., 2012).

Embora todos esses grupos sejam associados à diarreia, a distribuição, epidemiologia e impacto de cada sorogrupo mostram diferenças marcantes em várias espécies (MARTELLA et al., 2010). Os grupos A, B e C acometem a espécie humana e animal; enquanto que o D, E, F e G têm sido detectados apenas em animais (CIARLET; ESTES, 2002). O grupo mais frequentemente associado à diarreia neonatal dos suínos (PARRA et al., 2008; SALEM et al., 2010) e à gastroenterite em crianças menores de 5 anos de idade (MARTELLA et al., 2010) é o rotavírus do grupo A (PARRA et al., 2008; MARTELLA et al., 2010; SALEM et al., 2010). No entanto, tal agente também já foi detectado por Collins et al. (2010), em suínos assintomáticos de 4-5 e 8-9 semanas de idade, provenientes do sul da Irlanda.

Para o diagnóstico laboratorial dos rotavírus são normalmente utilizadas as técnicas de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE), ELISA, RT-PCR (ESTES; KAPIKIAN, 2007), microscopia eletrônica (ATHANASSIOUS et al., 1994; ESTES; KAPIKIAN, 2007),

aglutinação em látex (BRANDT et al., 1987), imunofluorescência, imunomicroscopia eletrônica (BRIDGE; WOODE, 1975), radioimunoensaio (CUCKOR; BERRY; BLACKLOW, 1978) e contraímunoeletroforese (CANDEIAS; ROSENBERG; RÁCZ, 1978), cada uma com suas vantagens e limitações.

A PAGE tornou-se uma importante técnica laboratorial e epidemiológica na caracterização das amostras de vírus. Consiste em extrair o RNA viral e observar os segmentos genômicos de acordo com a sua mobilidade eletroforética (HERRING et al., 1982). Assim, permite a detecção de rotavírus de qualquer grupo, apresentando alta especificidade analítica (ESTES; KAPIKIAN, 2007) e dispensando o desenvolvimento de reagentes imunológicos (HERRING et al., 1982). No entanto, este teste possui a desvantagem de ter uma execução relativamente complexa, dificultando o processamento em grande quantidade de amostras (JEREZ, 1997). Além disso, apresenta baixa sensibilidade analítica, uma vez que é preciso grande quantidade de rotavírus nas fezes para a geração de sinal, quando comparada, por exemplo, à PCR para a detecção de rotavírus (XU; HARBOUR; MCCRAE, 1990; ESTES; KAPIKIAN, 2007).

A técnica de ELISA é uma alternativa bastante sensível e com maior praticidade metodológica (BEARDS et al., 1984; GREGORI et al., 2000). Contudo, depende diretamente da qualidade dos anticorpos empregados e de sua disponibilidade, assim como os outros testes sorológicos (imunofluorescência, imunomicroscopia eletrônica e radioimunoensaio).

A aglutinação em látex é uma técnica rápida, simples e de alta especificidade. Porém, apresenta baixa sensibilidade, dependendo do estágio da doença (BRANDT et al., 1987).

Por sua vez, a reação de RT-PCR é utilizada em função da sua alta sensibilidade e especificidade (WALTER, 2001), aliada à possibilidade de caracterizar os genótipos virais em conjunto com a detecção (GOUVEA; SANTOS; TIMENETSKY, 1994a,b), desde que haja *primers* adequados.

Hussain, Seth e Broor (1995) e Buesa et al. (1996), através de comparações entre as sensibilidades analíticas da RT-PCR e *nested* RT-PCR com as do ELISA, demonstraram que as primeiras podem ser 100 a 1000 vezes superiores, respectivamente.

Uma variação da PCR, designada de *multiplex* PCR, tem sido utilizada no diagnóstico de diarreias virais de suínos (SONG et al., 2006; OGAWA et al., 2009), assim como a

multiplex nested RT-PCR (SALEM et al., 2010). Esta técnica consiste na utilização de diferentes pares de *primers*, tendo a finalidade de amplificar simultaneamente múltiplas regiões de ácidos nucleicos presentes em uma mesma amostra. Neste sentido, ela apresenta vantagens, como economia de custos, tempo e amostras de volume limitado (ELNIFRO et al., 2000; RATCLIFF et al., 2007).

Já técnica de PCR quantitativa (qPCR) traz entre outras vantagens, ser um teste de diagnóstico que apresenta maior sensibilidade analítica quando comparado às provas de ELISA e PCR convencional no diagnóstico das rotaviroses (GUTIÉRREZ-AGUIRRE et al., 2008). Aliás, considerando que a via de transmissão do rotavírus é fecal-oral, contando com importante participação do ambiente, água, alimentos e fômites (SAIF; ROSEN; PARWANI, 1994; COOK et al., 2004), esta técnica pode também ser muito útil na detecção do agente nos efluentes das criações e coleções d'água, já que nestes casos o vírus apresenta-se diluído, havendo inclusive a necessidade de métodos preliminares de concentração, nem sempre efetivos ou práticos (NISHIDA; RUIZ; GREGORI, 2010).

2.1.1 Características morfológicas

O rotavírus pertence à família *Reoviridae* e ao gênero *Rotavírus* (CARTER; SAUNDERS, 2007; KING et al., 2012). Apresenta simetria icosaédrica (CARTER; SAUNDERS, 2007), não é envelopado e mede aproximadamente 75 nm de diâmetro. O prefixo *Reo-* (proveniente da denominação *Reoviridae*) surgiu em virtude do isolamento do vírus com genoma caracterizado por duas fitas de RNA dos tratos respiratório e entérico de humanos e animais, com a possibilidade deste vírion não causar nenhuma doença (orphan). O genoma deste vírus consiste em 11 fitas duplas de RNA (dsRNA), envoltas por uma tripla camada proteica (ESTES; KAPIKIAN, 2007), sendo a mais interna (“*core*”) constituída pelas proteínas VP1, VP2 e VP3; a intermediária pela VP6, que também serve de base para a classificação em grupos ou espécies virais (MARTELLA et al., 2007); e as duas mais externas, compostas pela VP4 e VP7, as quais estão independentemente envolvidas com a

indução de anticorpos neutralizantes e seus genes codificadores estão relacionados com a caracterização das amostras em genótipos P (protease-sensível) e G (glicoproteína), respectivamente (ESTES; KAPIKIAN, 2007; MARTELLA et al., 2007, 2008; STEYER et al., 2008).

Além das seis proteínas estruturais ou proteínas víricas (VP1-VP4, VP6 e VP7), o genoma do rotavírus também apresenta seis proteínas não estruturais (NSP1-NSP6) como componentes (STEYER et al., 2008). A existência de um genoma viral constituído por 11 segmentos, e 12 proteínas se explica pelo gene do segmento 11, o qual codifica duas proteínas, sendo elas a NSP5 e NSP6 (Figura 1) (MATTHIJNSSENS et al., 2008a). Para os rotavírus do grupo A, os principais alvos para a diferenciação de amostras são os genes codificadores da VP4 e VP7 (MASCARENHAS et al., 2007).

Figura 1 – Representação esquemática do genoma dos rotavírus de acordo com os seus 11 segmentos. O décimo primeiro segmento genômico está em destaque (flecha)

Fonte: adaptada de Carter e Saunders, 2007

2.1.2 Ocorrência

Segundo Bishop et al. (1973), as primeiras descobertas dos rotavírus datam aproximadamente das décadas de 50 e 60, quando partículas do agente foram encontradas em tecido intestinal de camundongos e swab retal de macacos por meio do uso da microscopia eletrônica. Em 1969, micro-organismos com morfologia semelhante a este vírus foram observados em amostras fecais de bovinos apresentando diarreia e posteriormente, a realização de passagens seriadas em células revelou o envolvimento do rotavírus na etiologia desta doença. O primeiro caso humano foi diagnosticado em 1973, baseado em exames de microscopia eletrônica da mucosa intestinal e de amostras fecais de crianças com diarreia. De acordo com Flewett et al. (1974), baseado na característica morfológica do vírion, que apresenta o formato de uma “roda” (rota), o nome rotavírus foi proposto neste mesmo período.

O uso combinado da microscopia eletrônica, análise genética do RNA do vírus por meio da eletroforese e de métodos baseados na detecção de antígenos revelou que linhagens do rotavírus circulantes em humanos e animais apresentam um grupo antigênico comum (SAIF; JIANG, 1994).

2.1.3 Classificação dos rotavírus do grupo A

Muitos dos métodos de diagnóstico imunológicos para rotavírus são baseados na detecção da VP6, a qual apresenta diferentes epítomos, que permitem a diferenciação em subgrupos (SG) específicos dentro do grupo A dos rotavírus: SG I, SG II, SG I + II, ou SG não-I, não-II. Estes são distinguidos de acordo com a reatividade com dois anticorpos monoclonais (BEARDS; DESSELBERGER; FLEWETT, 1989). Posteriormente, com base na caracterização molecular, foram considerados apenas dois grupos genotípicos dentro do grupo

A de rotavírus humano: grupo I: SG I; grupo II: SG II, SG I + II, e SG não-I, não-II (ITURRIZA-GÓMARA, 2002).

Em 1985, um esquema de classificação foi proposto para incluir a presença desses múltiplos “grupos” dos rotavírus e a existência de “sorotipos” que se cruzam entre a espécie humana e animal (GRAHAM; ESTES, 1985). Mais tarde, em 1989, um sistema de classificação binário, derivado da estrutura genômica e da reatividade imunológica da VP7 e VP4, foi estabelecido (CIARLET; ESTES, 2002). Até o presente, já foram reconhecidos 27 genotipos para VP7 e 35 para VP4 (MATTHIJNSSENS et al., 2011), sendo que aparentemente há uma predominância de certos genotipos infectando determinadas espécies hospedeiras (BÁNYAI et al., 2005).

Com o aumento da facilidade da execução de sequenciamentos, a classificação antigênica tem sido substituída pelo sistema de classificação dos rotavírus dentro dos genotipos com base na comparação da identidade das sequências genômicas do vírion já existentes. Quando a sequência obtida contempla a *open reading frame* (ORF) completa do gene, os valores “*cut-off*” de identidade da região codificante do segmento genômico devem ser seguidos para a classificação de um novo genotipo. Nos casos em que somente a sequência parcial do gene é viável, para que se estabeleça um novo genotipo, no mínimo 500 nucleotídeos e 50% da ORF do gene devem ser determinados, e a porcentagem de similaridade deve estar 2% acima do “*cut-off*” (MATTHIJNSSENS et al., 2008a).

Nesse sentido, o quadro 1 representa os genes, os valores do “*cut-off*” da porcentagem de identidade da ORF e a quantidade de genotipos, já estabelecidos até o momento, dos rotavírus.

Quadro 1 – Gene, valores do “*cut-off*” da porcentagem de identidade da ORF, quantidade de genótipos e origem da denominação destes

Gene	Valores do “ <i>cut-off</i> ” da porcentagem de identidade da ORF (%)	Genótipos	Nome dos genótipos
VP7	80	27G	<u>G</u> licosilada
VP4	80	35P	<u>P</u> rotease-sensível
VP6	85	16I	Capsídeo <u>I</u> ntermediário
VP1	83	9R	<u>R</u> NA-dependente RNA-polimerase
VP2	84	9C	Proteína interna (“ <u>C</u> ore”)
VP3	81	8M	<u>M</u> etiltransferase
NSP1	79	16A	Interferon <u>A</u> ntagonista
NSP2	85	9N	<u>N</u> TPase
NSP3	85	12T	Aumento da <u>T</u> radução
NSP4	85	14E	<u>E</u> nterotoxina
NSP5	91	11H	Fosfoproteína (“p <u>H</u> osphoprotein”)

Fonte: adaptada de Matthijssens et al. (2008a); Matthijssens et al. (2011)

É importante ressaltar que nenhuma classificação foi obtida para NSP6, visto que a ORF desta proteína está contida dentro do segmento genético codificador da NSP5, e, neste contexto, numa análise filogenética, se observaria uma identidade muito próxima entre estas duas proteínas não estruturais. De acordo com a nomenclatura ora vigente, os genótipos de rotavírus são assim especificados: Gx-P[x]-Ix-Rx-Cx-Mx-Ax-Nx-Tx-Ex-Hx, usadas para os genes codificantes da VP7-VP4-VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5/6, respectivamente (MATTHIJNSSENS et al., 2008a).

2.1.4 *Rotavírus suínos*

Os rotavírus suínos constituem-se numa das causas mais frequentes de diarreia nas criações, ocorrendo de forma enzoótica e acometendo principalmente animais nas fases de maternidade e creche (WIELER et al., 2001). No Brasil já foram descritos em diferentes regiões e momentos, o que denota sua ampla disseminação (SAN JUAN et al., 1986; GATTI et al., 1989; ALFIERI et al., 1994; RÁCZ et al., 2000; BARREIROS et al., 2003; GREGORI et al., 2009).

Apesar de a mortalidade depender da gravidade do quadro de diarreia, do grau de desidratação e da associação com outros agentes (SOBESTIANSKY et al., 1998), os rotavírus acabam por influir negativamente na performance zootécnica e uniformidade dos lotes de uma maneira contínua.

Em suínos, são descritos com maior frequência os genótipos G3, G4 e G5 associados com P[6] ou P[7] (CHAN-IT et al., 2008; GREGORI et al., 2009).

2.1.5 *Proteínas estruturais do core (VP1, VP2 e VP3)*

As proteínas do core (VP1, VP2 e VP3) funcionam como constituintes estruturais e cada uma tem afinidade com o RNA de fita simples (ssRNA). Essas proteínas têm importante papel no processo de transcrição e replicação do RNA (ZENG et al., 1998).

A VP1, codificada pelo segmento 1, é uma RNA polimerase, e há evidências de que essa proteína necessita da VP2, codificada pelo segmento 2, para a atividade de replicação (ZENG et al., 1998). A VP3, codificada pelo segmento 3, pode ligar-se à região aminoterminal da VP2, localizada na camada mais interna da proteína, onde a VP1 e o ssRNA permanecem ligados (ZENG et al., 1998; ESTES, 2001).

2.1.6 Proteínas estruturais do capsídeo interno e externo (VP4, VP6 e VP7)

A VP4 (Figura 2), codificada pelo quarto segmento genômico, trata-se de uma proteína não glicosilada. Possui 776 aminoácidos e constitui 1,5% da proteína do vírion (ESTES, 2001). É semelhante a uma hemaglutinina e sofre clivagem proteolítica resultando na formação dos peptídeos VP5* e VP8*, os quais são ligados por um peptídeo de conexão sensível à ação de proteases. Em várias amostras de rotavírus, o sítio potencial de clivagem de lisina ou arginina se encontra na extremidade 5' do gene: aminoácido 246 nas amostras humanas e 247 naquelas animais (PATTON, 1986).

Figura 2 – Representação esquemática da VP4 de rotavírus. Estão indicados os sítios de ligação do ácido siálico e dos anticorpos monoclonais 7A12 e 2G4 e o domínio de fusão

CR – regiões conservadas

V – regiões variáveis

HR – região repetitiva

AS – sítio de ligação do ácido siálico

7A12 – sítio de ligação do anticorpo monoclonal 7A12

2G4 – sítio de ligação do anticorpo monoclonal 2G4

Fonte: adaptada de Estes (2001) e Tihova et al. (2011)

O peptídeo VP5* está associado com a atividade de neutralização cruzada entre os diferentes tipos de VP4, e possivelmente possui os epítomos responsáveis pela adsorção do vírus à célula com uma região variável e outra conservada. Também é associado com a restrição da replicação de certas amostras de rotavírus em cultura de células e associado à virulência em camundongos e suínos (GREENBERG et al., 1983). Além disso, induz a produção de anticorpos neutralizantes, conferindo imunidade protetora em seres humanos e animais (OFFIT; BLAVAT, 1986).

O peptídeo VP8*, por outro lado, contém a maioria dos epítomos associados às reações tipo-específicas. Uma grande variação foi observada entre os resíduos de aminoácidos 71 e 204 da VP8* (LARRALDE et al., 1991). Em virtude de a VP8* conter uma grande diversidade nos sítios de ligação dos anticorpos monoclonais, especulou-se que ela fica mais exposta na partícula viral, o que poderia explicar as regiões de diversidade nas sequências dessa região (MACKOW et al., 1988).

De acordo com Tihova et al. (2011), o receptor para o anticorpo 7A12, presente na região da VP8*, apresenta reação neutralizante somente com rotavírus do genotipo P[5], e o sítio de ligação para o anticorpo monoclonal 2GA, o qual fica na região da VP5*, neutraliza rotavírus dos genótipos P[5], P[6] e P[7].

A VP6, codificada pelo sexto segmento genômico, é uma proteína dotada de caráter hidrofóbico com elevado potencial antigênico e imunogênico (GORZIGLIA et al., 1985). Localiza-se na camada intermediária do vírus e circunda o *core*; representa 51% do agente e exerce um papel importante na estrutura da partícula viral, devido à interação com as proteínas VP4 e VP7 do capsídeo externo, e a VP2 do *core*. Estas características, aliadas à presença de epítomos conservados entre diferentes amostras do vírus, sustentam ser tal proteína o antígeno de eleição para os ensaios diagnósticos (ESTES, 2001).

A VP7 (Figura 3), codificada pelo nono segmento genômico, é uma glicoproteína do capsídeo externo, sendo a segunda mais abundante do vírion. Forma a matriz do capsídeo, sendo responsável pela indução dos anticorpos neutralizantes, incluindo aqueles sorotipo-específicos. Constitui 30% da proteína viral (MATTION; COHEN; ESTES, 1994); apresenta uma ORF composta de 326 resíduos de aminoácidos; e domínios hidrofóbicos designados de H1 (aminoácidos 1 a 30) e H2 (aminoácidos 33 a 48), que podem funcionar como uma

sequência “sinalizadora” que orienta a VP7 para o retículo endoplasmático (RE) (GREEN et al., 1988; NISHIKAWA et al., 1989).

Reconstruções estruturais da VP7 têm evidenciado sua estrutura trimérica que forma oligômeros com as proteínas VP4 e NSP4 nas células infectadas. A interação com o Ca^{2+} parece ser importante no processo de montagem da VP7 (Figura 3) dentro do capsídeo externo (MAASS; ATKINSON, 1990; DORMITZER; GREENBERGER, 1992).

Figura 3 – Representação esquemática da VP7 de rotavírus. Estão indicados os domínios hidrofóbicos, os sítios de ligação com o Ca^{2+} e os epítomos de neutralização

H1 e H2 – domínios hidrofóbicos

Ca^{2+} - sítio de ligação com o cálcio

A, B e C – epítomos de neutralização

Fonte: adaptada de Estes (2001)

2.1.7 Proteínas não estruturais

A NSP1, codificada pelo quinto segmento genômico, apresenta papel importante no ciclo de replicação do rotavírus, inibindo a resposta imune inata do hospedeiro, principalmente restringindo a secreção de interferon (INF) (FENG et al., 2009) e suprimindo a indução de apoptose durante os estágios iniciais da infecção (ARNOLD; PATTON, 2011).

A NSP2, codificada pelo sétimo segmento genômico, denota função relevante na formação dos viroplamas e na replicação do genoma do rotavírus. É uma enzima multifuncional (HU et al., 2012), liga-se à ssRNA e desarranja a conformação em hélice deste ácido nucleico (TARAPOREWALA; PATTON, 2001). Adicionalmente, exibe as seguintes funções: NTPase dependente de Mg^{2+} (TARAPOREWALA; CHEN; PATTON, 1999); RNA trifosfatase (RTPase) (VASQUEZ-DEL CARPIO et al., 2006); e atividades nucleosídeo difosfato quinase (NDP) (KUMAR et al., 2007).

A NSP3, codificada pelo oitavo segmento genômico, facilita a tradução dos RNA mensageiros (mRNAs) transcritos e suprime a síntese de proteínas do hospedeiro através do seu papel antagonista da proteína de ligação da cauda “poli A” (PABP) (CHUNG; MCCRAE, 2011). Embora os rotavírus não sejam poliadenilados, superam esta falta da cauda “poli A” pela existência de uma sequência consenso (5'-GUGACC-3') para o final 3' do mRNA do grupo A desses agentes virais. Esta sequência se liga especificamente à porção N-terminal da NSP3, a qual apresenta função análoga a da PABP. Já a porção C-terminal interage com o fator de iniciação de tradução de eucariotos – 4 gama (eIF4G), localizado na porção 5' do mRNA, o qual, como resultado desta interação passa a apresentar a conformação de um *hairpin*. A NSP3 apresenta maior afinidade de ligação ao eIF4G do que a PABP, o que promove o aumento da tradução dos transcritos virais e a diminuição da síntese de proteínas da célula do hospedeiro. Adicionalmente, esta proteína previne a degradação do mRNA do vírus por nucleases celulares (DEO et al., 2002; GROFT; BURLEY, 2002).

A NSP4, codificada pelo décimo segmento genômico, é essencial para a transcrição, replicação e morfogênese dos rotavírus (SILVESTRI et al., 2005). Sintetizada como uma glicoproteína transmembrana do retículo endoplasmático, na porção N-terminal, apresenta três domínios hidrofóbicos: H1, H2 e H3. No primeiro, há dois sítios de glicosilação. Entre os aminoácidos 47 a 92, posição que engloba o domínio H3, há uma região com características de uma vioporina, a qual desestabiliza a homeostase do Ca^{2+} celular através da liberação desse cátion para fora do retículo endoplasmático (HU et al., 2012). Entre os domínios que funcionam como sítios de ligação, há um envolvido na indução da diarreia através da interação com a integrina I da membrana plasmática das células, evento que sinaliza um aumento de Ca^{2+} intracelular, dependente da fosfolipase C, e a subsequente liberação de Cl^- do lúmen intestinal através da ativação do canal da proteína transmembrana 16A (OUSINGSAWAT et al., 2011). A porção C-terminal dessa proteína apresenta regiões de

ligação a microtubulos, as quais agem como receptores intracelulares para as partículas de dupla camada (DPL) (abordadas no item 2.1.9), facilitando a infecção de partículas já montadas (XU; BELLAMY; TAYLOR, 2000). Outras atividades relacionadas à NSP4 englobam a desestabilização da integridade da membrana, a inibição da absorção de Na^+ e dos transportadores de sódio e glicose 1 (SGLT1) (abordado no item 2.1.10) (OUSINGSAWAT et al., 2011).

A NSP5, codificada pelo décimo primeiro segmento genômico, é uma fosfoproteína rica em resíduos de serina e treonina. O único papel firmemente estabelecido, até o momento, para a esta proteína é a ligação dela com a NSP2 para a formação dos viroplasmas (HU et al., 2012), a qual é regulada por Ca^{2+} e dirigida à porção C-terminal do gene que codifica a NSP5 (SEN; SEN; MACKOW, 2007).

A NSP6, também codificada pelo décimo primeiro segmento genômico, apresenta alta taxa de rotatividade e é degradada dentro de aproximadamente duas horas após a sua síntese. Possui afinidade com o ssRNA e dsRNA. Embora haja sugestões de que esta proteína se localize nos viroplasmas (RAINSFORD; MCCRAE, 2007), o papel completo desta proteína na replicação dos rotavírus ainda precisa ser elucidado (HU et al., 2012).

2.1.8 *Mecanismos de evolução dos rotavírus e transmissão interespécies*

A diversidade genética dos rotavírus está associada a diferentes mecanismos de evolução. Estes incluem as mutações pontuais ("*drifts*"); rearranjos ("*rearrangements*"), reestruturações ("*shifts*" / "*reassortants*") (MARTELLA et al., 2010) e recombinações intragênicas (PARRA et al., 2004).

Nas mutações pontuais, substituições de bases são observadas por meio de técnicas de mapeamento e sequenciamento de nucleotídeos (FLORES et al., 1988). Os rearranjos denotam alterações de porções consideráveis na sequência de um único segmento genômico, algumas vezes na forma de deleções, e frequentemente como duplicações. Diversas variantes

com rearranjos gênicos e fenotipos alterados têm sido isoladas (DESSELBERGER, 1996). Nas reestruturações, ocorre a permuta de material genético entre dois vírus do mesmo grupo ou da mesma espécie durante infecções mistas *in natura* ou por meio de co-cultivo (RAMING, 1997).

Quando os rearranjos ocorrem entre linhagens humanas e animais, pode resultar em um vírus quimérico. Estes organismos gerados podem ser mais eficientes nos processos de infecção e disseminação dentro de uma população de novos hospedeiros. O método de hibridização de RNA tem proposto evidências moleculares da restrita relação interespecies entre genotipos de humanos e de algumas espécies animais, principalmente suínos e bovinos (MARTELLA et al., 2010).

Considerando a origem genotípica dos rotavírus e a espécie animal infectada por tal agente, este pode ser classificado em uma linhagem homóloga ou heteróloga. Na primeira, a infecção ocorre em uma espécie específica para todos os genes do vírus. Já na segunda, se observa uma linhagem dotada de diversidade genética e que pode apresentar genes de origem humana e de diferentes espécies animais (MARTELLA et al., 2010).

2.1.9 Replicação

Os rotavírus infectam os enterócitos maduros na superfície apical das vilosidades do intestino delgado. A replicação ocorre no citoplasma das células. Posteriormente, as partículas virais são liberadas no lúmen intestinal e o processo replicativo tem continuidade na porção distal do intestino delgado (ESTES, 2001). Inicialmente, ocorre a clivagem da VP4 pela ação de enzimas proteolíticas (como a tripsina), resultando em duas proteínas: VP8* e VP5*. Esse mecanismo facilita a entrada do micro-organismo na célula. A adsorção do vírus à célula hospedeira ocorre, primeiramente, pelo sítio de ligação das proteínas VP4, VP8* e VP5*, e depois, através da VP7. Há evidências de que a VP5* e a VP7 se liguem às integrinas. Tal agente viral pode entrar na célula por duas formas: penetração direta ou endocitose. Na primeira, o rotavírus atravessa a membrana plasmática diretamente. Este evento é mediado

por uma região hidrofóbica da VP5* (CARTER; SAUNDERS, 2007). Estudos demonstram que, nesta etapa, a VP8* interage com o ácido siálico (HEWISH; TAKADA; COULSON, 2000).

Dentro da célula, a camada externa do agente viral é removida, deixando somente uma DPL, na qual o processo de transcrição é ativado. A partir daí, cada um dos 11 segmentos genômicos é associado à VP1, a qual sintetiza uma nova cópia de RNA de sentido positivo. Entre estes RNAs resultantes, uma parte atua como mRNA, enquanto que outra funciona como um padrão para a síntese de RNA negativo, permitindo a continuidade do mecanismo de transcrição. A NSP2 e NSP5 são responsáveis pela formação dos viroplasmas, onde ocorre a formação das proteínas estruturais internas (VP1, VP2 e VP3). A VP6 é adicionada aos viroplasmas, finalizando então uma progênie de DPL. A partir daí, começa o mecanismo de tradução, e nos estágios finais de formação de novos vírus, a VP4, VP7 e NSP4 são sintetizadas no retículo endoplasmático rugoso (RER), permanecendo depois localizadas na membrana deste. A NSP4 apresenta sítios de ligação para VP4 e para as DPL. Após se ligarem, estes componentes formam um vírus ainda imaturo, o qual atravessa a membrana, e segue para dentro de uma vesícula (situada dentro do RE), a qual forma temporariamente um “envelope” contendo a VP7. Em seguida, ocorre a clivagem de moléculas de VP7 que seguem em direção à membrana para construir a camada externa do agente viral e a VP4 é adicionada. Os novos vírus formados podem sair das células pelo processo de lise ou exocitose (CARTER; SAUNDERS, 2007), tal como esquematizado na figura 4.

Figura 4 – Ciclo de replicação do rotavírus

Fonte: adaptada de Carter e Saunders (2007)

2.1.10 Patogenicia

Primariamente, as alterações patológicas se limitam ao intestino delgado, em cujas células ocorre a replicação dos rotavírus. Nas infecções por este micro-organismo observam-se alterações histopatológicas, como vacuolização e perda dos enterócitos, encurtamento das vilosidades e hipertrofia das criptas. A patogenicia das rotaviroses é multifatorial e ambos os

fatores (virais e do hospedeiro) participam no desenvolvimento da doença. As proteínas VP3, VP4, NSP1, VP6, VP7, NSP2, NSP3, e NSP4 estão envolvidas na virulência do agente. A NSP3 participa da síntese de diversas proteínas; e também, juntamente com a VP6, tem papel na disseminação extra-intestinal do vírus. A VP4 e a VP7 são responsáveis pela entrada do agente nas células. A NSP1 regula a indução do INF. Além disso, o processo diarreico tem sido atribuído a vários mecanismos, incluindo a má-absorção secundária à destruição dos enterócitos, isquemia das vilosidades e ativação do sistema nervoso entérico (ESTES; KAPIKIAN, 2007).

O terço apical das vilosidades é o local de predileção para a replicação dos rotavírus (SAIF et al., 1997). A replicação destes micro-organismos no citoplasma dos enterócitos promove liberação de íons Ca^{2+} a partir do RE (BRUNET et al., 2000). O aumento de Ca^{2+} intracelular ativa uma série de mecanismos, incluindo a inibição da atividade do citoesqueleto nas microvilosidades; redução na expressão das dissacaridases e outras enzimas da superfície apical; inibição dos SGLT1 e necrose celular (PEREZ et al., 1998). Com o aumento na permeabilidade da membrana celular, ocorre elevação de íons Na^+ e diminuição de íons K^+ intracitoplasmáticos (HALAIHEL et al., 2000a). Segundo Castillo et al. (1991), a alteração no equilíbrio dinâmico desses eletrólitos pode comprometer a absorção de NaCl e a ativação de SGLT1, tendo como consequência uma maior perda de água e eletrólitos.

Não há dúvida com relação à importância dos mecanismos de má absorção nas rotavirose. No entanto, Vellenga et al. (1992) observaram a presença de diarreia aquosa em suínos, experimentalmente infectados, associada à ausência de lesões histológicas até 48 horas após a infecção, sugerindo envolvimento de mecanismos de secreção na patogênese dessa diarreia.

Essa observação pode ser esclarecida a partir do reconhecimento da NSP4 como enterotoxina (BALL et al., 1996; ESTES; KAPIKIAN, 2007), característica que confere a esta proteína importante papel na indução de diarreia. Após sair das células infectadas pelo rotavírus, tal mecanismo tem efeitos parácrinos em células adjacentes não infectadas, desencadeando um sinal na trajetória da transdução, e levando à mobilização do Ca^{2+} intracelular e secreção de Cl^- . Além da região apical das vilosidades, a NSP4 pode localizar-se na superfície basolateral das células e na porção mais baixa das vilosidades intestinais. Quando assume a primeira localização, tal proteína interage com a laminina e fibronectina (ESTES; KAPIKIAN, 2007). Em adultos, esse evento tem pouco efeito na indução de

diarreia, possivelmente pela baixa expressão de canais de Cl^- dependentes de Ca^{2+} . Mas, essa toxina também é capaz de inibir especificamente a atividade do SGLT1, o que contribui para a ocorrência de má absorção intestinal em infectados não englobados dentro da faixa etária considerada como jovem (HALAIHEL et al., 2000b).

2.1.11 Eventos imunológicos

A resposta imune inata contra o rotavírus inicia-se pela indução da produção de INF, mediada pela dsRNA do vírus (MCDONALD; PATTON, 2011). Após a penetração viral na célula do hospedeiro, a replicação do micro-organismo é reconhecida pelos seguintes receptores: gene 1 induzido pelo ácido retinóico (RIG-1) e gene 5 associado ao melanoma diferenciado (MDA-5). Estes, por sua vez, ativam dois fatores de transcrição: fator regulador de INF 3 (IRF3) e o fator de transcrição nuclear- $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$). Estas moléculas são conduzidas para o núcleo, onde induzem a transcrição de gene estimulador de INF (ISG). A produção da NSP1, durante a replicação viral, pode induzir à degradação da IRF3. Através de mecanismos dependentes ou independentes do rotavírus, a translocação do NF- $\kappa\beta$ para o núcleo da célula pode ser bloqueada. Após a transcrição do INF, a proteína quinase dependente de dsRNA (PKR) modula a secreção de mais INF por um mecanismo desconhecido até o momento. A secreção autócrina de INF sinaliza a ativação da transcrição de três fatores: transdutores de sinal e ativadores de transcrição 1 e 2 (STAT1 e STAT2) e o fator regulador de INF 9 (IRF9). Estas moléculas deslocam-se para o núcleo da célula e aumentam os níveis de transcrição do ISG e do INF, estabelecendo um “estágio antiviral”. Ocorre também o bloqueamento do STAT1 e STAT2 pelo rotavírus por um mecanismo desconhecido até então (Figura 5) (ANGEL; FRANCO; GREENBERG, 2012).

Figura 5 – Modulação do sistema imune inato do hospedeiro contra o rotavírus

Fonte: adaptada de Angel, Franco e Greenberg (2012)

Em relação à imunidade humoral, a importância dos níveis de imunoglobulina A (IgA) em relação à resistência contra rotavíruses severas em humanos foi evidenciada (HJELT et al., 1987). Em suínos, foi considerada uma associação direta observada entre o grau de proteção e o nível de IgA secretada pelas células intestinais e presente no soro (TÔ et al 1998; YUAN et al, 1998). Na ausência de IgA, um estudo em camundongos, evidenciou um efeito compensatório de outras imunoglobulinas, em particular a imunoglobulina G (IgG) (O'NEAL; HARRIMAN; CONNER, 2000). Já foi evidenciada, tanto em humanos como em animais, a expansão da resposta imunológica sorotipo-específica seguida da subsequente reinfeção natural ou induzida por vacina com o mesmo ou outro sorotipo (GREEN et al., 1990).

Os dados já estabelecidos sobre a imunidade celular contra as rotavirose evidenciam que as células T CD8⁺ desempenham o papel primordial nas infecções primárias pelo vírus. Após a primeira infecção, a ação destas células pode permanecer por até duas semanas ou por até três meses. Considera-se que não há mais evidências deste tipo de imunidade em no máximo oito meses após a primeira infecção pelo agente viral (DHARAKUL; ROTT; GREENBERG, 1990).

2.1.12 Vacinas

Vacinas para a prevenção de rotavirose em bovinos, suínos e caprinos têm sido avaliadas há muitos anos. A prevenção dessa doença nesses animais é baseada na administração parenteral tanto de vacinas inativadas como atenuadas. Com o objetivo de promover uma imunidade passiva, as vacinas são administradas nas mães de tais espécies animais no último estágio da gestação. Esta estratégia de imunização também requer a administração apropriada de colostro para os neonatos (MARTELLA et al., 2010). No Brasil, há dois tipos de vacina comercialmente disponíveis contra o rotavírus suíno do grupo A: SERKEL GASTRO RV[®] e PORCILIS[®] 2*4*3. Ambas também visam à prevenção da *Escherichia coli* e *Clostridium perfringens*, e devem ser administradas pela via intramuscular. Não há informações sobre a primeira em relação aos sorotipos de rotavírus contidos na vacina. Em relação à segunda, apenas G4 e G5 são contemplados.

Conforme Ward, McNeal e Steele (2008), as primeiras tentativas visando ao desenvolvimento de uma vacina humana contra rotavírus começaram pelos estudos denominados “Jennerianos”, os quais têm a vantagem de que linhagens de vírus de origem animal são frequentemente atenuadas naturalmente em humanos, ou o processo de atenuação pode ser realizado por meio de poucas passagens em tecido celular. As linhagens do vírion usadas nos estudos “Jennerianos” foram RIT4237 (derivada da *Nebraska Calf Diarrhea Virus* - NCDV), WC3 (bovina), e RRV (derivada da MMU18006 de macaco).

Todos os candidatos a essa vacina apresentaram tolerância e alguma proteção cruzada contra as linhagens de rotavírus humanas. Contudo, a proteção contra as rotavirose severas variou largamente. Enquanto a vacina produzida a partir de RIT4237 foi abandonada, novas pesquisas começaram a ser realizadas, visando o desenvolvimento de vacinas multivalentes focadas em WC3 e RRV. Estas novas investigações utilizaram as pesquisas “Jennerianas” de um modo modificado, com enfoque na capacidade do vírus de realizar o mecanismo de reestruturações. Produzidas em culturas celulares, essas vacinas foram compostas de genes de origem animal formados pelas proteínas superficiais (VP4 e VP7) provenientes da espécie humana (OFFIT; CLARK; WARD, 2003; HEATON; CIARLET, 2007).

A primeira vacina produzida contra rotavírus foi do tipo atenuada, multivalente e administrada por via oral. Foi formada a partir do evento de reestruturação entre macaco e humano, e denominou-se RotaShieldTM. Depois de mais de 15 anos de desenvolvimento e uso clínico, esta vacina foi licenciada pela “*United States Food and Drug Administration*” (FDA) e incorporada dentro do programa de vacinação infantil dos Estados Unidos em 1998. Em julho de 1999, os Centros de Controle de Doenças (CCDs) recomendaram o adiamento de tal programa, devido à possibilidade de associação da vacina com a ocorrência de intussuscepção, e a RotaShieldTM foi removida do mercado em outubro de 1999. Posteriormente, duas outras vacinas foram desenvolvidas para administração por via oral: RotaTeqTM e RotarixTM. Atualmente estas vacinas são licenciadas em diversos países do mundo. A primeira é uma vacina atenuada, formada de combinação pentavalente de cinco linhagens de rotavírus provenientes das reestruturações entre bovinos e humanos (G1-G4 e P[8]). Já a segunda é monovalente, baseada em uma linhagem humana (G1P[8]). Ambas as vacinas mostraram-se eficazes nos estudos clínicos de fase III, e não evidenciaram risco de invaginação intestinal. Estas vacinas demonstraram considerável proteção contra a infecção associada às rotavirose em países desenvolvidos (ESTES; DESSELBERGER, 2012). No entanto, há uma diminuição significativa da eficácia dessas vacinas em países de baixa renda, localizados nos continentes africano e asiático, quando comparados com países das Américas e da Europa (MADHI et al., 2010).

Outra vacina contra rotavírus administrada por via oral – a “*Lanzhou Lamb Rotavirus*” (LLR) – é licenciada na China desde 2000. Esta vacina foi desenvolvida diretamente de uma linhagem do vírion de origem ovina, a Lp14 (G10P[15]) (CIARLET et al., 2008).

2.2 CORONAVIROSES

Juntamente com os Torovírus, os Coronavírus pertencem à família *Coronaviridae*, e ordem *Nidovirales*. Dentro desta mesma ordem, se encontra também a família *Artereviridae*, e dentro desta está o gênero *Arterivirus* (KING et al., 2012). Perlman e Netland (2009) incluem também dentro desta ordem a família *Roniviridae*, com o gênero *Okavirus*; e dentro da família *Coronaviridae* descrevem a existência de mais um gênero denominado *Bafinivirus*.

A família *Coronaviridae* é dividida em quatro gêneros (e adicionalmente em subgêneros) de acordo com suas características antigênicas e genéticas. Os *Alphacoronavirus* e *Betacoronavirus* infectam uma grande variedade de mamíferos (humanos, cães, gatos, porcos, morcegos, camundongos, ratos, cavalos, bovinos, entre outros); os *Gamacoronavirus* englobam principalmente aves e, mais recentemente, a baleia branca (*Delphinapterus leucas*), e os *Deltacoronavirus*, que atingem sapos, bulbul e munia. Estes dois últimos hospedeiros pertencem à ordem dos *Passeriformes*, e às famílias *Pycnonotidae* e *Estrildidae*, respectivamente (BELOUZARD et al., 2012; KING et al., 2012).

2.2.1 Coronavírus suínos

Já foram descritos mundialmente quatro coronavírus suínos: Vírus da Gastroenterite Transmissível dos Suínos (TGEV), Coronavírus Respiratório Suíno (PRCoV), Vírus da Diarreia Epidêmica Suína (PEDV), todos estes pertencentes ao gênero *Alphacoronavirus* (estando o primeiro no subgênero *Geselavirus*), e o Vírus Hemaglutinante da Encefalomielite Suína (PHEV), pertencente ao gênero *Betacoronavirus* (MASTERS, 2006; WOO et al., 2009).

O TGEV é transmitido pela via fecal-oral e acomete leitões levando-os a uma diarreia, por vezes letal, altamente contagiosa, e, em adultos, causa além destes sintomas, agalaxia (PENSAERT; CALLEBAUT; COX, 1994; PEMBERTON, 1999). Presente em todos os continentes, a Gastroenterite Transmissível (TGE) é uma doença de notificação à OIE (Organização Mundial de Saúde Animal) dada a sua importância socioeconômica significativa no comércio de animais e produtos de origem animal (BATISTA; VALLE; MARTELL, 2005).

O primeiro isolado de PRCoV ocorreu, especificamente, na Bélgica e teve como origem tecidos respiratórios de suínos que apresentavam um aumento de anticorpos contra TGEV (PENSAERT; CALLEUBAUT; VERGOTE, 1986). Ao se analisar estes vírus, uma homologia de 96% foi observada entre PRCoV e TGEV. Três deleções foram consideradas como diferenças principais, sendo duas observadas na região da ORF3a, a qual codifica uma proteína não-estrutural, de função desconhecida, enquadrada como um pseudogene, e uma localizada no gene S (SCHWEGMANN-WEßELS; HERRLER, 2006). A transmissão do PRCoV se dá por via aerógena (PENSAERT; CALLEUBAUT; VERGOTE, 1986) e, segundo Rodák et al. (2005a), houve uma diminuição na incidência de TGEV amplamente influenciada pela disseminação do PRCoV em suínos.

Ambos os agentes (TGEV e PRCoV) usam a aminopeptidase N (APN) para reconhecerem as células e começarem o processo de replicação. A APN localiza-se em uma região do gene codificador da proteína S homóloga entre os dois vírus (SCHWEGMANN-WEßELS; HERRLER, 2006), especificamente entre os resíduos 522 e 744 da proteína (SCHULTZE et al., 1996). Nesse sentido, Sánches et al. (1999) ainda acrescentaram que por esse motivo o PRCoV também pode ser encontrado nas fezes em determinada quantidade, nos casos em que durante o processo de replicação o envelope do vírus formado apresenta o gene S com tropismo para os tratos respiratório e entérico.

O PEDV, transmitido pela via fecal-oral, foi inicialmente descrito na Inglaterra e afeta preponderantemente suínos na creche causando uma enterite aguda, sendo endêmico em diversos países como Alemanha, Canadá, Japão, Coréia, França, Bélgica e China. Os sintomas clínicos da Diarreia Epidêmica Suína (PED) incluem anorexia, vômito, diarreia e desidratação. A mortalidade em animais de até 5 dias é próxima a 100%, diminuindo proporcionalmente com a idade (JUNWEI et al., 2006).

O HEV é um vírus transmitido por secreções nasais, tendo como porta de entrada a mucosa oronasal. Dissemina-se através dos nervos periféricos para o sistema nervoso central, resultando numa encefalomielite ou ainda num quadro clínico que envolve depressão, anorexia e vômito, denominado “*Vomiting and Wasting Disease*” (MÖSTL, 1990; HIRANO et al., 2004).

No Brasil, são raros os trabalhos que visaram o estudo dos coronavírus suínos. Romero et al. (1985) detectaram anticorpos neutralizantes para o TGEV. Entretanto, os animais testados não apresentaram sintomatologia clínica da doença. Este achado não foi confirmado em termos de um diagnóstico direto do agente, podendo inclusive estar relacionado com o PRCoV, uma vez que anticorpos neutralizantes para estes dois coronavírus podem apresentar reações cruzadas.

Cappellaro et al. (1998) utilizando microscopia eletrônica descreveram o achado de partículas semelhantes a coronavírus em suínos acometidos em um surto de diarreia no município de Mairinque, São Paulo, no ano de 1988.

Porém, esta técnica pode apresentar resultados falso-positivos devido à morfologia pleomórfica dos coronavírus (ATHANASSIOUS et al., 1994), e falso-negativos em função da baixa sensibilidade analítica desta técnica (FLEWETT, 1978), sendo necessária a execução de uma técnica de confirmação. Uma alternativa é a utilização da imunoeletromicroscopia que permite uma melhor acurácia, no entanto necessita da produção de um antissoro altamente específico ou de anticorpos monoclonais (ATHANASSIOUS et al., 1994).

Brentano et al. (2002), realizaram um levantamento soroepidemiológico para PRCoV e TGEV a partir de 2675 soros suínos colhidos entre 1996 e 1999, sem encontrar evidências sorológicas para infecções destes vírus no período em questão.

Várias estratégias têm sido utilizadas no diagnóstico dos coronavírus suínos, entre elas o isolamento viral em células de linhagem de rim de porco (CPK, PK-15), porém apresentando algumas limitações, como a necessidade de várias passagens cegas e a confirmação dos achados por outras técnicas (PATON et al., 1997).

No tocante às reações de diagnóstico direto baseadas em ELISA, apesar de descritas, implicam no desenvolvimento de anticorpos monoclonais para assegurar sensibilidade e especificidade dos testes (RODÁK et al., 2005a,b) ou mesmo em padronizações em condições

laboratoriais (“*in-house*”), não sendo comercialmente disponíveis (OH et al., 2005). A imunoistoquímica também pode ser utilizada para o diagnóstico do TGEV. Técnicas anatômicas, imunológicas e bioquímicas são associadas nesta técnica, o que permite localizar componentes tissulares específicos ou agentes invasores, mediante a utilização de anticorpos específicos e moléculas marcadoras (GUEDES, 2011). No entanto, apresenta as mesmas desvantagens do ELISA.

Contornando tais limitações, a transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) facilitou o diagnóstico dos coronavírus, visando, de uma maneira geral, a detecção de genes de maior conservação entre os diferentes grupos. Inicialmente, Stephensen, Casebolt e Gangopadhyay (1999) desenvolveram uma RT-PCR baseada na ORF1b do gene codificador da RNA-dependente RNA-polimerase (RdRp). Posteriormente, Moës et al. (2005) propuseram novos *primers* para esta mesma região, particularmente considerando a ocorrência do (então) novo coronavírus humano NL63.

Brandão et al. (2005), por sua vez, padronizaram uma reação do tipo *nested* dirigida ao fragmento gerado pelos *primers* originalmente desenvolvidos por Stephensen, Casebolt e Gangopadhyay (1999), visando à detecção dos *Betacoronavirus*.

O diagnóstico diferencial entre o TGEV e o PRCoV mediante RT-PCR foi descrito por Paton et al. (1997), no qual esses agentes são diferenciados através de uma única reação que gera produtos de tamanhos diferentes para cada um dos dois vírus com base na deleção presente no gene codificador da proteína S do PRCoV.

Jung et al. (2003) definiram um protocolo visando diferenciar o PEDV do TGEV de amostras fixadas em formalina e embebidas em parafina, possibilitando estudos retrospectivos em amostras arquivadas, tendo como alvos os genes M e N. Sekiguchi et al. (2004) padronizaram uma reação de *nested* RT-PCR para o HEV visando diferentes áreas do genoma viral, entre elas o gene RdRp e S.

Partindo da hipótese sobre o fato do mRNA para a proteína N ter um número mais abundante de cópias durante a replicação viral, Hui et al. (2004) ao padronizarem um teste de RT-PCR para o Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Severa (SARS-CoV) observaram ganhos de sensibilidade média de 26% ao desenharem *primers* visando o gene N, em relação a ORF1b.

Além dos métodos baseados em RT-PCR, o método baseado na qPCR também pode ser encontrado na literatura pertinente (ESCUTENAIRE et al., 2007)

2.2.2 Ocorrência

Os primeiros coronavírus isolados foram o Vírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas (IBV) na década de 30, e o Vírus da Hepatite dos Camundongos (MHV) e o TGEV na década de 40 (BEAUDETTE; HUDSON, 1937; CHEEVER et al., 1949; DOYLE; HUTCHINGS, 1946). A coronavirose ganhou particular notoriedade na Saúde Pública a partir do aparecimento do SARS-CoV em 2003. Esta epidemia gerou o aparecimento de teorias da capacidade da transmissão e adaptação interespecies dos coronavírus (WEISS; NAVAS-MARTIN, 2005).

Dados posteriores evidenciaram um coronavírus similar ao SARS-CoV, resultante da infecção no homem e da adaptação deste em morcegos (LI et al., 2005). Além disso, Woo et al. (2009) evidenciaram que os coronavírus de morcegos são portadores de um conjunto de genes dos *Alphacoronavirus* e *Betacoronavirus*. Estes autores sugerem ainda que os coronavírus das aves apresentam o grupo genético dos *Gamacoronavirus*, e que o ancestral de todos esses vírus estava presente em um morcego e foi transmitido para uma ave, ou vice-versa. Este fenômeno ocorre em virtude da habilidade dessas espécies (morcegos e aves) em migrar para longas distâncias, permitindo a troca do material genético dos vírus entre hospedeiros de diferentes espécies. Isto predispõe a enorme diversidade de coronavírus em morcegos e aves, assim como, a disseminação deste agente viral para outras espécies de animais.

Os coronavírus suíno, canino e felino mostram evidências de recombinação uns com os outros, indicando a presença deles em uma mesma população. Recentes eventos de recombinação entre estirpes do sorotipo 1 de coronavírus canino (CCoV) e coronavírus felino (FCoV) e um coronavírus desconhecido até o momento resultou em dois novos vírus: CCoV e FCoV, que foram incluídos em um sorotipo 2. A análise de sequências resultantes sugeriu que

o TGEV resultou da transmissão interespecíes do sorotipo 2 do CCoV de um canino infectado (LORUSSO et al., 2008).

2.2.3 *Características morfológicas*

Os coronavírus são agentes envelopados e pleomórficos. O genoma viral consiste em um RNA linear, não segmentado, de sentido positivo, associado à fosfoproteína estrutural N, formando um nucleocapsídeo de simetria helicoidal (HOLMES; LAI, 1996; LAI; CANAVAGH, 1997), e de comprimento que varia entre 26 e 32 kb (PERLMAN; NETLAND, 2009).

O envelope é formado por uma dupla camada de lipídeos, de onde se projetam as proteínas estruturais, resultando no aspecto de uma coroa (do latim corona) (MASTERS, 2006). Ele contém pelo menos três dessas proteínas virais, a proteína “*spike*” (S), a proteína de membrana (M), e a proteína do envelope (E). Adicionalmente, alguns coronavírus também apresentam a hemaglutinina esterase (HE). O genoma do vírion é composto de no mínimo seis ORFs. A primeira compreende dois terços do genoma e codifica a proteína replicase, enquanto que o último terço contém as proteínas estruturais do genoma na seguinte ordem: (HE)-S-E-M-N (Figura 6) (PERLMAN; NETLAND, 2009).

Figura 6 – Genoma de quatro diferentes coronavírus

Legenda:

A: Vírus da Peritonite Infecciosa Felina (FIPV), Vírus da Hepatite dos Camundongos (MHV-A59), Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Severa (SARS-CoV), e Vírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas (IBV)
B: Estrutura de um coronavírus

Enquanto as proteínas M e E estão envolvidas na montagem viral (BELOUZARD et al., 2012), a proteína S é responsável pela aparência espiculada da partícula viral e pela atividade hemaglutinante, sendo o principal alvo para anticorpos neutralizantes e envolvida diretamente com as interações entre as células do hospedeiro quando em infecção (GÉLINAS et al., 2001), apresentando como decorrência adaptativa, um elevado polimorfismo (CAVANAGH, 1995). Esta última proteína é dividida em duas subunidades: S1 e S2 (HOLMES; LAI, 1996; NAVAS-MARTIN; WEISS, 2003). A primeira engloba a porção N-terminal da molécula proteica, formando a região globular das espículas. A S1 é responsável pela ligação do vírus a receptores específicos, existentes em células suscetíveis, e, dentro do contexto de sua função, apresenta grande variabilidade, associada à antigenicidade e patogenicidade do vírus. Em contraste, a subunidade S2 é mais conservada e constitui a haste das espículas (porção C-terminal). A proteína S dos *Alphacoronavirus* (como o TGEV e PEDV) não é clivada em nenhum momento do ciclo de replicação do vírus, diferente de determinados coronavírus, como alguns *Betacoronavirus* e todos os *Gamacoronavirus*, que tem como uma das características, a clivagem da proteína S entre os domínios S1 e S2 durante o processo de penetração na célula. Tal proteína também induz a fusão do envelope viral com

a membrana da célula hospedeira, e algumas vezes, a fusão de duas células (BELOUZARD et al., 2012).

A glicoproteína HE, segundo Vlasak et al. (1988), apresenta uma atividade de acetilesterase, a qual cliva grupos acetil de 9-O-ácido acetilneuramínico, prevenindo ou revertendo a hemaglutinação. Esta propriedade sugere que a HE esteja relacionada com a invasão ou saída do agente das células infectadas. Além disso, de acordo com Popova e Zhang (2002) essa proteína pode mediar a adsorção do vírus à membrana celular, mas a penetração do micro-organismo na célula requer a interação com a proteína S.

Seguindo a estrutura da proteína M, há um domínio helical e um amplo domínio carboxilterminal, localizados dentro do envelope do vírion (LAI; CANAVAGH, 1997), exceto em alguns coronavírus, como o TGEV, no qual a região carboxiterminal desta proteína fica exposta na superfície viral (RISCO et al., 1995).

A proteína E possui canais iônicos que são importantes durante o processo de replicação. Em ação conjunta com a proteína M, ambas são importantes durante o processo de saída do vírus da célula por brotamento (VENEMMA et al., 1996), mas somente a proteína E é suficiente para deixar a vesícula formada nas células transfectadas (MAEDA; MAEDA; MAKINO, 1999). A proteína N apresenta três domínios estruturais relativamente conservados, incluindo a porção responsável pela ligação do RNA à sequência *leader* (localizada na porção final da região 5' do mRNA) (LAI; CANAVAGH, 1997). Tal proteína interage com a M, conduzindo a incorporação do nucleocapsídeo dentro de partículas virais (KUO; MASTERS, 2002). Dentro deste contexto, esta proteína está localizada em sítios de produção e montagem do RNA viral (COMPTON et al., 1987).

No início do genoma dos coronavírus estão contidas as 16 proteínas não-estruturais do vírion (Figura 7) (DENISON et al., 2011). Esta região consiste em duas ORFs (1a e 1b), e também é conhecida por polimerase ou *pol*. A tradução das proteínas da ORF1b depende de um sinal iniciador, localizado na junção da ORF1a com a ORF1b. Estas ORFs são traduzidas dentro de uma poliproteína, a qual é uma precursora de proteínas no processo de transcrição e replicação. A maioria dos coronavírus, exceto o IBV e o SARS-CoV, codificam duas proteases semelhantes à papaína na região da ORF1a (SAIKATENDU et al., 2005). Elas incluem a PL1pro e PL2pro, que estão contidas na proteína NSP3 (IMBERT et al., 2006).

Todos os coronavírus codificam uma protease semelhante à quimiotripsina, a qual é denominada 3CLpro (SAIKATENDU et al., 2005), e estão contidas na proteína NSP5 (IMBERT et al., 2006).

Figura 7 – Representação esquemática do SARS-CoV, demonstrando as 16 proteínas não estruturais da ORF1 (regiões em cinza claro)

Fonte: Denison et al. (2011)

Além da NSP3, que é uma proteína multifuncional, apresentando também atividade adenosina difosfato ribose (ADP-ribose) e 1-fosfatase (SAIKATENDU et al., 2005), a ORF1a também codifica mais três proteínas: NSP7, NSP8 (ZHAI et al., 2005) e NSP9 (EGLOFF et al., 2004). Perlman e Netland (2009) descreveram também outras proteínas, designadas como NSP1, NSP6 e NSP10.

A ORF1b codifica a RdRp e uma proteína helicase multifuncional (SEYBERT et al., 2000), as quais estão contidas nas proteínas NSP12 e NSP13, respectivamente (IMBERT et al., 2006). Além da atividade de helicase, esta proteína também inclui atividades de nucleosídeo-trifosfatase (NTPase) e deoxinucleotídeos- trifosfatase (dNTPase), e 5-trifosfatase (SEYBERT et al., 2000). A ORF1b também codifica uma exonuclease (Exon); endoribonuclease (NendoU); e uma 2-O-ribose metiltransferase (2-O-MT) dependente da S-adenosilmetionina (SNIJDER et al., 2003). A primeira está contida na proteína NSP14 (ECKERLE et al., 2007), na qual também está presente a N7-guanina-metiltransferase (N7-MTase) (CHEN et al., 2009). A segunda é codificada pela NSP15, e a última pela NSP16 (DECROLY et al., 2008).

Uma nova proteína estrutural para o SARS-CoV foi identificada, como sendo o produto de uma ORF denominada 3a. O estudo de sequências dessa linhagem de coronavírus humano sugerem que a proteína ORF3a foi uma mutação em paralelo com a proteína S, que

resultou na adaptação do coronavírus em células da espécie humana durante a epidemia que ocorreu em 2003 (SONG et al., 2005).

2.2.4 Replicação

Os coronavírus são capazes de se ligarem a variados tipos de receptores localizados na superfície das células dos hospedeiros. Entre os *Alphacoronavirus*, o Coronavírus Humano-229E (HCoV-229E), o PEDV, o TGEV, e o sorotipo 2 do FCoV e do CCoV usam a APN (presente nas células do hospedeiro) como receptor para executar a adsorção e iniciar o processo de replicação (WEISS; NAVAS-MARTIN, 2005). A APN, também conhecida como CD13, é uma proteína transmembrana tipo II, que é expressa na superfície apical das células epiteliais dos tratos respiratório e entérico. Há evidências de que as diferenças no tropismo desses vírus ocorrem devido à habilidade da proteína S em reconhecer pequenas diferenças espécie-específicas nos aminoácidos da APN (TUSSEL; SCHITTONE; HOLMES, 2007). A proteína S do HCoV-229E, PEDV, TGEV, e do sorotipo 2 do FCoV e do CCoV apresenta uma alta homologia. No entanto, os domínios de ligação ao receptor das células estão localizados em regiões não homólogas (BELOUZARD et al., 2012).

Ao penetrar no citoplasma das células, o genoma de sentido positivo já funciona como o primeiro mRNA, sendo traduzido em uma poliproteína, a replicase. Por meio de fitas intermediárias de sentido negativo, esta enzima utiliza o genoma como modelo para a síntese de RNA genômico e mRNA subgenômicos. Os últimos são traduzidos separadamente em proteínas estruturais, as quais atravessam a membrana do RE, e posteriormente, são transportadas para um compartimento intermediário no retículo endoplasmático de Golgi (ERGIC). Os nucleocapsídeos são formados pela encapsidação do RNA genômico pela proteína N, e subsequentemente, coalescem com componentes de ligação da membrana do ERGIC (MASTERS, 2006).

Em alguns desses vírus, uma fração da proteína S, que não participa da montagem do vírus, vai para a superfície da célula infectada, e pode ocasionar a fusão desta com uma célula adjacente não infectada, levando à formação de sincícios multinucleados. Este fenômeno torna capaz a disseminação viral independentemente de componentes extracelulares, sendo portanto, um mecanismo de escape do sistema imunológico (MASTERS, 2006).

Finalmente, a progênie viral deixa a célula infectada por meio do transporte em vesículas de parede lisa (Figura 8) (MASTERS, 2006; PERLMAN; NETLAND, 2009).

Figura 8 – Ciclo de replicação dos coronavírus

Fonte: Masters (2006)

2.2.5 Coronavírus mutantes

Assim como a maioria dos RNA vírus, os coronavírus apresentam ampla mutação, devido aos elevados erros nas frequências de RNA polimerase, que apresentam uma taxa num intervalo de cerca de 10^{-4} a 10^{-6} (SANJUÁN et al., 2010). O exemplo mais notável da importância biológica de deleções mutantes é a emergência do PRCoV a partir do TGEV, que ocorreu na década de 80 na Europa, como se fosse um novo vírus que causou uma infecção respiratória epizootica e se disseminou largamente entre os suínos (LAUDE; VAN REETH; PENSAERT, 1993). A comparação da sequência nucleotídica de ambos os vírions identificou que o PRCoV foi um derivado do TGEV (WESLEY; WOODS; CHEUNG, 1991).

2.2.6 Patogenia

A maioria dos coronavírus se replica nas células epiteliais dos tratos respiratório e entérico. Alguns, como o PRCoV, replicam-se principalmente no primeiro, enquanto que outros, como o TGEV e PDEV, infectam as células entéricas (WEISS; NAVAS-MARTIN, 2005). Infecções intestinais inaparentes em animais adultos mantêm o vírus em uma população (COMPTON; BARTHOLD; SMITH, 1993). Acredita-se que talvez esses agentes sejam altamente resistentes à degradação pelas proteases (bile, enzimas proteolíticas) dos tecidos celulares pelo fato de que as proteínas do envelope são glicosiladas. Além do trato respiratório e entérico, os coronavírus podem se disseminar para outros tipos de células epiteliais, e também podem causar infecções sistêmicas no hospedeiro (LAI; PERLMAN; ANDERSON, 2007).

O HEV apresenta tropismo pelas células epiteliais do trato respiratório superior e pelo sistema nervoso central (SNC), onde chega por meio do transporte axonal retrógrado nos nervos periféricos. Ele se replica no epitélio de revestimento do trato respiratório e das criptas das tonsilas, no neuroepitélio da mucosa nasal e nos nerônios do trato digestivo (ANDRIES; PENSAERT, 1980). No entanto, este coronavírus não causa doença ou infecção no tecido entérico, somente no trato respiratório e no SNC (SAIF, 2004a). Até o momento, o receptor celular que este vírus utiliza para realizar a adsorção à célula é desconhecido (PERLMAN; NETLAND, 2009). A infecção se dissemina pelos nervos presentes no estômago do suíno infectado, impedindo o esvaziamento do estômago e resultando em vômito (LAI; PERLMAN; ANDERSON, 2007).

O TGEV acomete suínos em qualquer fase do sistema de produção, sendo capaz de replicar-se em enterócitos, os quais se encontram em vários estágios de diferenciação. A diarreia por má absorção ocorre pela diminuição da atividade das enzimas (dissacaridases e peptidases) presentes nas microvilosidades do epitélio intestinal e pela redução na absorção de Na^+ e Cl^- (HOMAIDAN et al., 1991). Em relação à patogenicidade desse mesmo agente, Schwegmann-Weßels e Herrler (2006) descreveram que o TGEV é um típico agente enteropatogênico. Os suínos são infectados pela via gastrointestinal. No estômago, o TGEV resiste ao baixo pH e consegue, então, infectar as células colunares epiteliais existentes na porção apical das vilosidades do jejuno e íleo. As células infectadas mudam de morfologia, resultando em atrofia das vilosidades, seguida de diarreia grave. Um dos fatores patogênicos desse vírion envolve o ácido siálico, presente na proteína S e que confere capacidade hemaglutinante ao agente.

Em contraste, a variante respiratória do TGEV (PRCoV) não apresenta essa capacidade, pois a região onde se encontra o ácido siálico está localizada na porção de deleção da proteína S observada nesse micro-organismo. É importante ressaltar que a atividade exercida pelo ácido siálico é apenas uma função acessória, que oferece maior virulência e patogenicidade ao micro-organismo. Mas a ausência desse receptor (como ocorre no PRCoV) não impede a replicação do agente (SCHWEGMANN-WEßELS; HERRLER, 2006). De acordo com Krempf et al. (1997), esta região que confere atividade hemaglutinante ao TGEV está localizada entre os resíduos 145 e 155 da proteína S (Figura 9).

Figura 9 - A flecha de cor vermelha aponta para a região de deleção do PRCoV em relação ao TGEV

Fonte: adaptada de Schwegmann-Weßels e Herrler (2006)

A susceptibilidade das células de diferentes órgãos para o TGEV, segundo descrito por Schwegmann-Weßels e Herrler (2006), depende de diversos fatores, entre eles, a idade do animal, condições ambientais, dose viral e virulência do agente. A evolução da doença é mais grave em animais jovens com até duas semanas de idade, os quais começam a apresentar vômito em aproximadamente 20 horas após a infecção com posterior diarreia grave. Esses sinais clínicos resultam em desidratação dos leitões, que morrem em dois a cinco dias após a infecção. Em relação aos suínos com idade mais avançada, estes se recuperam da gastroenterite, mas apresentam retardo no crescimento. A gravidade da enfermidade em animais jovens se explica pela presença da glicoproteína semelhante à mucina (MGP), a qual é reconhecida pelo ácido siálico. Essa proteína se localiza principalmente nas células globulares, as quais são responsáveis pela síntese e secreção de mucina. Além disso, a MGP auxilia o vírus a penetrar na camada mucosa e prosseguir para os enterócitos, onde iniciam a infecção. Adicionalmente, Kreml et al. (2000) mostraram que essa ligação da MGP ao ácido siálico pode ser um mecanismo de defesa do coronavírus contra a ação de substâncias emulsificantes do intestino.

2.2.7 Eventos imunológicos

No processo de imunidade ativa contra os coronavírus as atividades dos linfócitos T e dos anticorpos são cruciais (BERGMANN; LANE; STOHLMAN, 2006). Na resposta inicial, a expressão do IFN é essencial. Contudo, os coronavírus desenvolveram estratégias para prevenir a ação desse mediador (VERSTEEG et al., 2007). Um dos mecanismos é a inibição da indução de IFN por parte das proteínas virais, particularmente, a N, NSP1 e NSP3 (YE et al., 2007; NARAYANAN e al., 2008). A região ORF6 inibe a sinalização de IFN por meio da ligação com a $\alpha 2$ -carioferina, e para isso conduz esse receptor às membranas citoplasmáticas (FRIEMAN et al., 2007). Isto previne a translocação nuclear de proteínas contendo sinais clássicos e importantes, incluindo os STAT1, um componente crucial na trajetória da sinalização do IFN α , IFN β e IFN γ (ZHAO et al., 2009). Observou-se também uma função importante desta região codificante na degradação do mRNA e na inibição do processo de tradução (NARAYANAN e al., 2008). Adicionalmente ao IFN, muitas quimiocinas e citocinas são produzidas como parte da resposta imunológica contra os coronavírus. Em uma pesquisa realizada com o SARS-CoV, evidenciou-se citocinas, como a interleucina (IL)-1, IL-6 e IL-2, e quimiocinas, como a IL-8, além de mediadores pró-inflamatórios, como as ciclooxygenases (CAMERON et al., 2007).

2.2.8 Vacinas

A biologia das infecções por coronavírus sugere um desafio para o desenvolvimento de uma vacina eficiente contra este vírus. Estudos devem ser realizados para melhorar o desempenho das vacinas contra IBV e CCoV. (SAIF, 2004b). O coronavírus apresenta ampla variabilidade genética e antigênica, tem habilidade para executar o mecanismo de

recombinação e, além disso, as infecções naturais pelo agente não previne contra reinfecções. Nesse sentido, para a primeira característica, uma vacina não providenciaria uma proteção igualitária contra a ampla variedade antigênica, e para a segunda, o mecanismo de recombinação pode aumentar a variabilidade de linhagens do vírus, fazendo-se necessário o desenvolvimento de uma nova vacina contra o novo tipo antigênico. Em relação às reinfecções, pode-se observar que uma vacina somente seria considerada eficaz no sentido de melhorar a imunidade induzida por uma infecção natural (WANG; JUNKER; COLLISON, 1993).

Apesar dessas desvantagens para se conseguir o desenvolvimento de uma vacina eficiente na proteção contra as coronaviroses, em suínos, o PRCoV atua como uma vacina naturalmente atenuada contra a TGEV. A infecção do trato respiratório dos suínos pelo PRCoV causa uma infecção inaparente ou uma doença de fraca repercussão, podendo ajudar na proteção de animais contra doenças entéricas severas, oriundas da subsequente exposição ao TGEV (LAUDE; VAN REETH; PENSAERT, 1993).

Uma vez que as coronaviroses em suínos não foram descritas no Brasil, até o momento (OIE, 2013), não há vacinas comercialmente disponíveis para esta espécie.

3 OBJETIVOS

O presente estudo teve os seguintes objetivos:

Pesquisar a ocorrência de rotavírus e coronavírus a partir de amostras fecais de suínos, utilizando-se a técnica de RT-PCR.

Caracterizar os genótipos G e P dos rotavírus detectados, mediante o sequenciamento dos genes codificadores VP7 e VP4, respectivamente, e elaborar inferências filogenéticas a partir destes dados.

Caracterizar molecularmente as amostras positivas para coronavírus, caso estes sejam detectados.

Contribuir para o entendimento e prevenção das principais enteropatias virais suínas, mediante discussão dos resultados gerados.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os materiais e a metodologia utilizados neste estudo estão descritos nos itens a seguir:

4.1 AMOSTRAS DE CAMPO E DE REFERÊNCIA

Foram coletadas 218 amostras fecais de suínos de um dia a quatro semanas de idade, apresentando preferencialmente sintomas de diarreia, provenientes de 12 diferentes municípios do Estado de São Paulo: Leme, Itapeva, Iracemópolis, Piedade, Pedra Bela, Limeira, Bragança Paulista, Boituva, Embu-guaçu, Ibiúna, Nova Odessa e Itú. Uma granja de cada município foi analisada, exceto em Itú, de onde foram colhidas fezes de duas granjas, sendo 20 animais de uma e 37 da outra. Estas regiões apresentam concentração e importância na suinocultura paulista (LUPA – CATI – 2007/2008). As amostras foram colhidas nos anos de 2011 e 2012, e armazenadas a -20°C até o processamento.

Como padrão positivo nas reações de detecção de rotavírus do grupo A, foi utilizada a amostra NCDV, mantida em células da linhagem MA-104. Para o coronavírus, foi usada a amostra Kakegawa, mantida em cultura de células da linhagem pulmão de hamster (HmLu).

O mapa 1 demonstra os diferentes municípios de origem das amostras fecais.

Mapa 1 – Origem das amostras fecais de suínos provenientes do Estado de São Paulo

Fonte: Toniatti (2013)

4.2 ANÁLISE *IN SILICO* DOS *PRIMERS*

Previamente à execução do presente estudo, foram analisados os *primers* descritos no quadro 2 , com o objetivo de se verificar se estes contemplam a diversidade dos rotavírus e coronavírus a partir dos depósitos do *Genbank*.

Quadro 2 - Descrição dos *primers* analisados no presente estudo: organismo, *primer*, sequência (5'→3'), comprimento do produto (pb), posição no genoma, referência utilizada

continuação

Organismo	Primer	Sequência (5'→3')	Comprimento do produto (pb)	Posição no genoma	Referência
Rotavírus suíno do grupo A	VP6 (senso)	GAC GGV GCR ACT ACA TGG T	380	747 a 765	Iturriza Gomáza et al. (2002)
	VP6 (antisenso)	GTC CAA TTC ATN CCT GGT GG		1107 a 1126	
Rotavírus suíno do grupo A	P1 (senso)	GGC TTT TAA AGC GCT ACA GTG ATG TCT CT	317	1 a 29	Salem et al. (2010)
	P2 (antisenso)	GGT CGT GAT TGT GTT GAT GAA TCC ATA GA		289 a 317	
	P3 (senso)	CTC AGC ATT GAC GTA ACG AGT CTT CC	208	28 a 53	
	P4 (antisenso)	TGA GTG GAT CGT TTG AAG CAG AAT CAG A		208 a 235	
Vírus da Diarreia Epidêmica dos Suínos (PEDV)	M1 (senso)	GAA TTT TAC ATG GAA TAT CAT ACT GAC GAT ACT ACT TGT	425	25748 a 25786	
	M2 (antisenso)	CGC CAG TAG CAA CCT TAT AGC CCT CTA		26146 a 26172	
	M3 (senso)	TGC TTC AGT ATG GCC ATT ACA AGT ACT CTG	291	25789 a 25818	
	M4 (antisenso)	CCT GTC GGC CCA TCA CAG AAG TAG T		26055 a 26079	
Vírus da gastroenterite Transmissível (TGEV)	S1 (senso)	AGG GTA AGT TGC TCA TTA GAA ATA ATG GTA AGT T	951	20298 a 20331	
	S2 (antisenso)	CTA ATT TAC CAC TAA CCA ACG TGG AGC TAT TA		21217 a 21248	
	S3 (senso)	AAA AAT TAT TTG TGG TTT TGG TTG TAA TGC C	793	20369 a 20399	
	S4 (antisenso)	GTG TAG TAA AAA CAT TAG CCA CAT AAC TAG CAC A		21128 a 21161	

Quadro 2 - Descrição dos *primers* analisados no presente estudo: organismo, *primer*, sequência (5'→3'), comprimento do produto (pb), posição no genoma, referência utilizada

conclusão					
Organismo	Primer	Sequência (5'→3')	Comprimento do produto (pb)	Posição no genoma	Referência
Pancoronavírus	2Bp (senso)	ACT CAR WTR AAT YTN AAA TAY GC	251	14915 a 14937	Stephensen, Casebolt e Gangopadhy ay (1999)
	4Bm (antisenso)	TCA CAY TTW GGA TAR TCC CA		15146 a 15165	
<i>Betacoronavirus</i>	CV2U (senso)	TAC TAT GAC TGG CAG AAT GTT TCA	136	14989 a 15012	Brandão et al. (2005)
	CV2L (antisenso)	AAC ATC TTT AAT AAG GCG RCG TAA		15101 a 15124	
Vírus da Gastroenterite Transmissível (TGEV) e Coronavírus Respiratório Suíno (PRCoV)	F1121 (senso)	TAT TTG TGG TYT TGG TYG TAA TGC	886 (TGEV)	20375 a 20399	Paton et al. (1997)
	R1122 (antisenso)	GGC TGT TTG GTA ACT AAT TTR CCA	205 a 214 (PRCoV)	21237 a 21260	

Nota: “pb” significando “pares de bases”

A princípio, os *primers* descritos por Iturriza-Gómara et al. (2002) foram confrontados frente às sequências de nucleotídeos atualmente publicadas no *Genbank*¹ acerca do gene VP6 dos rotavírus suínos por meio do programa *Bioedit* v.7.0.5 (HALL, 1999).

Para tal procedimento, foi realizado o alinhamento global das sequências obtidas de tal gene mediante o uso do *software Clustal W* v.2.1 (LARKIN et al., 2007) entre as diferentes amostras suínas recuperadas da literatura, conforme os *acession numbers* (EU372777; EU372776; DQ003295; DQ003294; FJ617209; DQ534018; AF317126; EF554152; AF317122; AF317124; AF317123; AF317125; DQ204741; DQ119822), e realizada uma análise visual das áreas de hibridização, tal como ilustrada na figura 10.

¹Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide>>. Acesso em: 20 fev. 2011.

Figura 10 – Ilustração da análise dos *primers* descritos por Iturriza-Gómara et al. (2002) acerca do gene VP6 do rotavírus do grupo A. Os retângulos pretos representam a área de anelamento dos *primers* senso (VP6F) e antisense (VP6R)

Fonte: Toniatti (2013)

A mesma análise descrita anteriormente foi realizada acerca do gene NSP5 dos rotavírus suínos do grupo A, confrontando desta vez os *primers* descritos por Salem et al. (2010). A análise visual, presente na figura 11, mostra as regiões de anelamento destes oligonucleotídeos iniciadores entre as diferentes amostras suínas recuperadas da literatura conforme os *accession numbers* (X15519; HQ268844; HQ268845; HQ268846; EF990698; HQ268843; HQ268842; EU169874; X80538; EF990690; EF990713; EF990694; DQ003299; DQ003298; DQ204739).

Figura 11 – Ilustração da análise dos *primers* descritos por Salem et al. (2010) acerca do gene NSP5 do rotavírus do grupo A. Os retângulos pretos representam os *primers* senso (P1) e antisense (P2) da PCR; e os vermelhos demonstram os *primers* senso (P3) e antisense (P4) da *nested PCR*

Além do rotavírus do grupo A, numa mesma reação, Salem et al. (2010) também direcionou a pesquisa do PEDV e do TGEV acerca dos genes M e S, respectivamente. Tal autor realizou um estudo que inferiu sobre o desenvolvimento de um *multiplex nested* RT-PCR para a detecção destes três agentes virais em amostras fecais de suínos apresentando quadro de diarreia.

Considerando que o PEDV e o TGEV também são alvos de pesquisa deste estudo, os oligonucleotídeos iniciadores direcionados aos genes M e S destes organismos, respectivamente, também foram analisados pelo mesmo procedimento já descrito. A análise deste gene está ilustrada na figura 12. Observam-se as diferentes amostras suínas recuperadas da literatura conforme os *accession numbers* (NC_003436; EU302820; EU287429; D89752; AY974335; FJ196192; FJ196191; EU542416; EU542415; AY653205; AY608890; DQ845249; AF015888; AF019893; FJ196190) e as regiões de anelamento dos *primers*.

Figura 12 – Ilustração da análise dos *primers* descritos por Salem et al. (2010) acerca do gene M do PEDV. Os retângulos pretos representam os *primers* senso (M1) e antisenso (M2) da PCR; e os vermelhos demonstram os *primers* senso (M3) e antisenso (M4) da *nested* PCR

Fonte: Toniatti (2013)

No que tange aos *primers* descritos por Salem et al. (2010) direcionados ao TGEV, as sequências acerca do gene S depositadas na literatura até o momento não apresentam a região onde *primer* senso da primeira amplificação (S1) se anela. Em vista disso, realizou-se, paralelamente, a análise dos *primers* descritos por Paton et al. (1997) acerca do mesmo gene. Entre as diferentes amostras suínas recuperadas da literatura, há onze sequências provenientes do TGEV e 2 do PRCoV (Figuras 13 e 14), conforme identificado adjacente aos *accession numbers* (FJ55618; EU074218; DQ811785; DQ811786; DQ811788; DQ811789; DQ201447; AJ271965; AF104420; Z35758; X53128; DQ811787; Z24675).

Figura 13 – Ilustração da análise dos *primers* acerca do gene S do TGEV e PRCoV. O retângulo vermelho representa o *primer* senso (S3) da *nested* PCR descrito por Salem et al. (2010); e o verde o *primer* senso (F1121) descrito por Paton et al. (1997)

Fonte: Toniatti (2013)

Figura 14 – Ilustração da análise dos *primers* acerca do gene S do TGEV e PRCoV. O retângulo preto representa o *primer* antisense (S2) da PCR; o vermelho o *primer* antisense (S4) da *nested* PCR descritos por Salem et al. (2010); e o verde o *primer* antisense (R1122) descrito por Paton et al. (1997)

Fonte: Toniatti (2013)

Em relação aos pancoronavírus, a figura 15 demonstra a região contemplada pelos *primers* descritos por Stephensen, Casebolt e Gangopadhyay (1999) e Brandão et al. (2005), para o Coronavírus Bovino (BCov), Vírus da Peritonite Infecciosa Felina (FIPV), Vírus da Encefalomielite Hemaglutinante dos Suínos (HEV), Vírus da Sialodacrioadenite dos Ratos (SDAV), CCoV, TGEV, OC43 (estirpe de Coronavírus Humano) e Coronavírus dos Perus (TCov), conforme os *acession numbers* (EF424616; EF424620; EF424619; EF424618;

EF424617; AF220295; AF124985; AF124986; AF124987; AF124988; AF124990; AF124989; AF124992; AF124991) e o tipo de coronavírus, identificado adjacente a eles.

Figura 15 – Ilustração da análise dos *primers* acerca do gene direcionado à ORF1b. Os retângulos pretos representam os *primers* senso (2Bp) e antisenso (4Bm) descritos por Stephensen, Casebolt e Gangopadhyay (1999); e os vermelhos demonstram os *primers* senso (CV2U) e antisenso (CV2L) descritos por Brandão et al. (2005)

Nota: BCoV – Coronavírus Bovino

FIPV – Vírus da Peritonite Infecciosa Felina

SDAV – Vírus da Sialodacrioadenite dos Ratos

TGEV – Vírus da Gastroenterite Transmissível

HEV – Vírus da Encefalomielite Hemaglutinante dos Suínos

CCoV – Coronavírus Canino

OC43 – estirpe de Coronavírus Humano

TCoV - Coronavírus dos Perus

Fonte: Tonietti (2013)

Cada um dos dezoito *primers* selecionados para a execução deste estudo foi submetido ao BLAST/n² para confirmar as sequências de maior identidade e avaliar possíveis inespecificidades (hibridização não relacionada ao gene alvo). A pesquisa da formação de homo e heterodímeros, e *hairpins* também foi realizada utilizando-se o aplicativo OligoAnalyzer 3.1³.

O quadro 3 ilustrado abaixo evidencia o comprimento do gene alvo dos organismos pesquisados no presente estudo.

Quadro 3 – Descrição do comprimento do gene alvo dos organismos pesquisados no presente estudo

Organismo	Genes alvo do presente estudo	Comprimento do gene alvo em nucleotídeos
Rotavírus do grupo A	NSP5	664 (MATTHIJNSSENS et al., 2008b)
Vírus da Diarreia Epidêmica dos Suínos (PEDV)	M	681 (CHEN et al., 2011)
Vírus da Gastroenterite Transmissível (TGEV)	S	4350 (ZHANG et al., 2007a)
Coronavírus Bovino	ORF1b	8154 (ZHANG et al., 2007b)

²Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>>. Acesso em: 20 fev. 2011.

³Disponível em: <<http://www.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/>>. Acesso em: 20 fev. 2011.

4.3 PREPARO DAS AMOSTRAS

Foram feitas suspensões fecais a 50% (p/v) em água previamente tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) das amostras colhidas, as quais posteriormente foram clarificadas por centrifugação a 12000g por 15 minutos a 4°C, tomando-se 250 µL do sobrenadante como amostra.

4.4 EXTRAÇÃO DE RNA

Após o preparo das amostras (item 4.3), foram intercalados a cada quatro tubos os controles negativos, contendo 250 µL de água tratada com DEPC, para o monitoramento de eventuais contaminações. Depois, foram adicionados aos tubos, 750 µL do reagente Trizol (Invitrogen®, Carlsbad, CA, USA), homogeneizando-os e os incubando à temperatura ambiente por cinco minutos.

Posteriormente, foram adicionados 200 µL de clorofórmio a cada tubo, homogeneizando-se e deixando em repouso por 10 minutos a 4°C, em centrífuga refrigerada. Os tubos foram centrifugados a 12000g por 15 minutos a essa mesma temperatura. A fase aquosa obtida neste processo foi então transferida para outro tubo, contendo os mesmos volumes de álcool isopropílico.

Efetuuou-se, então, leve homogeneização e os tubos foram incubados por 15 minutos a -20°C. Em seguida, os tubos, contendo as amostras, foram centrifugados a 12000g por 15 minutos a 4°C, e, subsequentemente, houve o desprezo do sobrenadante, vertendo o tubo pelo lado oposto ao que foi centrifugado.

A seguir, foram adicionados aos tubos 950 µL de etanol 75% (v/v) e foi feita leve homogeneização manual. Posteriormente, as amostras foram submetidas à centrifugação

12000g por 10 minutos a 4°C, e, subsequentemente, o sobrenadante foi desprezado, como já descrito anteriormente.

O sedimento do produto extraído foi seco mantendo o tubo em banho-maria seco a 56°C. Para a ressuspensão do RNA extraído foram utilizados 25 µL de água tratada com DEPC, deixando-se os tubos em banho-maria seco a 56°C por 10 minutos. O RNA extraído foi mantido a -20°C até o momento do uso.

4.5 REAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO REVERSA (RT)

Para a realização da transcrição reversa (RT), 7 µL de RNA extraído foi desnaturado a 95°C por cinco minutos e mantido logo em seguida, por 10 minutos em gelo. Foi adicionada em cada tubo, contendo o RNA desnaturado, uma solução (*mix*), constituída de 0,8 x *First Strand Buffer* (Invitrogen®, Carlsbad, CA, USA), 1 mM de cada dNTP (desoxinucleotídeos trifosfatos – dATP, dTTP, dCTP e dGTP - Invitrogen®, Carlsbad, CA, USA), 10 mM de DTT (dithiothreitol - Invitrogen®, Carlsbad, CA, USA), 2,5 ng de random primers (Invitrogen®, Carlsbad, CA, USA), 10 U M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen®, Carlsbad, CA, USA) e água tratada com DEPC q.s.p. 20 µL.

Após a adição desta solução, os microtubos foram homogeneizados levemente e submetidos a uma rápida centrifugação (*spin*). O *mix* foi preparado em fluxo destinado apenas ao trabalho com material não contaminado. Depois de preparado, a solução foi levada a outro fluxo, e adicionada aos microtubos, contendo o RNA desnaturado. Todas essas etapas foram executadas com os tubos mantidos em gelo. A RT foi realizada em termociclador a 37°C/ 60 minutos, seguida por um ciclo de 70°C/ 15 minutos.

4.6 AMPLIFICAÇÃO DO cDNA PELA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

A partir do DNA complementar (cDNA) foram realizadas em paralelo três diferentes reações: 1- *multiplex nested* PCR, segundo Salem et al. (2010) - item a; 2- *nested* PCR, de acordo com Stephensen, Casebolt e Gangopadhyay (1999) e Brandão et al. (2005) - item b; 3- PCR, conforme Paton et al. (1997) - item c, tal como esquematizado na figura 16:

Figura 16 - Esquema de diagnóstico para rotavírus e coronavírus suínos empregados no presente estudo

Fonte: Tonietti (2013)

A *multiplex nested PCR* (SALEM et al., 2010) teve três alvos: o gene NSP5 (Figura 1) para a detecção de rotavírus do grupo A; o gene M (Figura 17) para a detecção do PEDV; e o gene S (Figura 17) para a detecção do TGEV, gerando, na primeira amplificação, produtos de 317 pb, 425 pb e 951 pb, e, na segunda amplificação, produtos de 208 pb, 291 pb e 793 pb, respectivamente. A *nested PCR* (STEPHENSEN; CASEBOLT; GANGOPADHYAY, 1999; BRANDÃO et al., 2005) teve como alvo a ORF1b (Figura 17), gerando produtos de 251 pb na primeira amplificação, e de 136 pb na segunda amplificação. A estratégia de Paton et al. (1997) reside no fato da deleção próxima à extremidade 5' do gene S existente no PRCoV, gerando produtos de amplificação com 886 pb para o TGEV e 205-214 pb para o PRCoV, ao serem utilizados os *primers* por eles descritos.

Figura 17 - Representação esquemática da estrutura genômica de um *Alphacoronavírus*

Fonte: adaptada de Perlman e Netland (2009)

Legenda:

- A:** A flecha de cor preta aponta para a região da proteína M; a flecha de cor vermelha para a região da proteína S; e a flecha de cor azul para a região ORF1b
B: Diagrama esquemático de um coronavírus

a. Multiplex nested PCR (SALEM et al., 2010)

Na primeira amplificação, misturou-se 2,5 µL do respectivo cDNA à solução de PCR *mix*, a qual foi composta por 1 x *PCR Buffer*, 0,2 mM de cada dNTP, 0,5 pmol/µL de cada *primer* (P1 e P2, para detecção de rotavírus do grupo A; M1 e M2, para a detecção de PEDV; e S1 e S2, para a detecção de TGEV), 1,5 mM de MgCl₂, 1,25 U de *Taq DNA Platinum Polymerase* (Invitrogen®, Carlsbad, CA, USA) água tratada com DEPC q.s.p. 25 µL. A solução preparada foi submetida a 94°C/3 minutos para a desnaturação inicial da fita dupla de cDNA, seguida de 40 ciclos de 94°C/1 minuto, 60°C/1 minuto, 72°C/1 minuto, finalizando com 72°C/10 minutos para a extensão final do produto amplificado.

Na segunda amplificação, foram adicionados 5 µL do produto obtido na PCR à combinação de reagentes, que por sua vez foi composta por 1 x *PCR Buffer*, 0,2 mM de cada dNTP, 0,5 pmol/µL de cada *primer* (P3 e P4, para detecção de rotavírus do grupo A; M3 e M4, para a detecção de PEDV; e S3 e S4, para a detecção de TGEV), 1,5 mM de MgCl₂, 1,25 U de *Taq DNA Platinum Polymerase* (Invitrogen®, Carlsbad, CA, USA), água tratada com DEPC q.s.p. 27,5 µL. A solução preparada foi submetida a 94°C/3 minutos para a desnaturação inicial da fita dupla de cDNA, seguida de 30 ciclos de 94°C/30 segundos, 60°C/30 segundos, 72°C/1 minuto, finalizando com 72°C/10 minutos para a extensão final do produto amplificado.

b. Nested PCR (STEPHENSEN; CASEBOLT; GANGOPADHYAY, 1999; BRANDÃO et al., 2005)

Na primeira amplificação, misturou-se 2,5 µL do cDNA à solução de PCR *mix*, que foi composta por 1 x *PCR Buffer*, 0,2 mM de cada dNTP, 0,5 pmol/µL de cada *primer* (2Bp e 4Bm), 1,5 mM de MgCl₂, 1,25 U de *Taq DNA Platinum Polymerase* (Invitrogen®, Carlsbad,

CA, USA), água tratada com DEPC q.s.p. 25 µL. A solução preparada foi submetida a 94 °C/2 minutos para a desnaturação inicial da fita dupla de cDNA, seguida de 6 ciclos de 94°C/1 minuto, 40°C/2 minutos, 72°C/1 minuto; 36 ciclos de 94°C/1 minuto, 50°C/1,5 minutos, 72°C/1 minuto finalizando com 72°C/10 minutos para a extensão final do produto amplificado.

Na segunda amplificação, foram adicionados 5 µL do produto obtido na PCR à combinação de reagentes, que por sua vez foi composta por 1 x *PCR Buffer*, 0,2 mM de cada dNTP, 0,5 pmol/µL de cada *primer* (CV2U e CV2L), 1,5 mM de MgCl₂, 1,25 U de *Taq DNA Platinum Polymerase* (Invitrogen®, Carlsbad, CA, USA), água tratada com DEPC q.s.p. 27,5 µL. A solução preparada foi submetida a 94°C/2 minutos para a desnaturação inicial da fita dupla de cDNA, seguida de 26 ciclos de 94°C/1 minuto, 54,8°C/1,5 minutos, 72°C/1 minuto, finalizando com 72°C/10 minutos para a extensão final do produto amplificado.

c. PCR (PATON et al., 1997)

Misturou-se 2,5 µL do cDNA à solução de PCR *mix*, composta por 1 x *PCR Buffer*, 0,2 mM de cada dNTP, 0,5 pmol/µL de cada *primer* (F1121 e R1122), 1,5 mM de MgCl₂, 1,25 U de *Taq DNA Platinum Polymerase* (Invitrogen®, Carlsbad, CA, USA), água tratada com DEPC q.s.p. 25 µL. A solução preparada foi submetida a 94°C/2 minutos para a desnaturação inicial da fita dupla de cDNA, seguida de 32 ciclos de 95°C/45 segundos, 50°C/1 minuto, 72°C/2 minutos; finalizando com 72°C/5 minutos para a extensão final do produto amplificado.

Em todas as reações (itens a, b e c), os mesmos cuidados, já descritos anteriormente, foram executados em relação à inclusão dos controles negativos a cada quatro amostras para o monitoramento de eventuais contaminações, e quanto ao resfriamento do *mix* em gelo.

Em seguida, 10 µL de produtos amplificados foram misturados ao *Blue Juice Loading Buffer* (Invitrogen®, Carlsbad, CA, USA), analisados mediante eletroforese em gel de agarose a 1,5% e corados com 0,5 µg/mL de brometo de etídio, sendo consideradas positivas as amostras que apresentaram fragmento de tamanho compatível com a descrição contida no respectivo trabalho (item 4.6), tendo como referência o DNA *ladder* de 100 pb. Os géis foram fotografados em equipamento de fotodocumentação Syngene Ingenius Gel Documentation System (Syngene, Frederick, USA) .

4.7 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS DE ROTAVÍRUS DETECTADAS

As amostras de rotavírus detectadas foram caracterizadas quanto aos seus genótipos G (gene codificador da VP7) e P (gene codificador da VP4) mediante o emprego da reação de RT-PCR utilizando-se *primers* descritos por Gouvea, Santos e Timenetsky (1994a,b), e outros desenhados neste estudo (sCon3, VP4RV e VP7RV), onde os produtos da primeira amplificação foram imediatamente submetidos ao sequenciamento (item 4.8), ao invés de serem submetidos a uma reação do tipo *multiplex semi-nested* PCR para a genotipagem das amostras.

O protocolo consistiu em misturar 2,5 a 5 µL do respectivo cDNA à solução PCR *mix*, a qual foi composta por 1 x *PCR Buffer*, 0,2 mM de cada dNTP, 0,5 pmol/µL de cada *primer*, sendo sCon3 e Con2 ou VP4RV, para a genotipagem P, e sBeg9 e End9CRW8 ou VP7RV, para a genotipagem G, 1,5 mM de MgCl₂, 3 U de *Taq DNA Platinum Polymerase* (Invitrogen®, Carlsbad, CA, USA) e água tratada com DEPC q.s.p. 25 µL. A solução preparada foi submetida à 94°C/3 minutos para a desnaturação inicial do cDNA, seguida de 40 ciclos de 94°C/1 minuto, 42°C/2 minutos, 72°C/1minuto, seguido de 72°C/10 minutos para extensão final. Quando utilizados os *primers* VP4RV e VP7RV, a etapa de anelamento do ciclo consistiu em 50°C/1,5 minutos. As regiões acerca dos genes VP4 e VP7 (Figuras 2 e 3, respectivamente) contempladas pelos *primers* citados acima estão ilustradas na figura 18.

Figura 18 – Representação esquemática das regiões de anelamento dos *primers* acerca dos genes codificadores da VP4 e VP7

Fonte: Carter e Saunders (2007) ; Toniatti (2013)

Legenda:

A: representação esquemática das regiões de anelamento dos *primers* *sCon3*, *Con2* e *VP4RV* acerca do gene codificador da VP4

B: representação esquemática das regiões de hibridização dos *primers* *sBeg9*, *End9CRW8* e *VP7RV* acerca do gene codificador da VP7

C: Reconstrução de uma imagem de criomicroscopia eletrônica do rotavírus

Os *primers* utilizados para a caracterização das amostras de rotavírus estão representados no quadro 4.

Quadro 4 – Descrição dos *primers* utilizados para sequenciamento e genotipagem dos rotavírus: *primer*, sequência (5'→3'), tamanho do produto (pb), referência utilizada

Gene	Primer	Sequência (5'→3')	Tamanho do produto (pb)	Referência
VP4	sCon3 (senso)	TGG CTT CGC TCA TTT ATA GAC A	873	Este estudo
	Con2 (antisenso)	ATT TCG GAC CAT TTA TAA CC		Gouveia, Santos e Timenetsky (1994b)
	VP4RV (antisenso)	TAY TGC ATY TCY TTC CA	816	Este estudo
VP7	sBeg9 (senso)	GGC TTT AAA AGA GAG AAT TTC	1062	Gouveia, Santos e Timenetsky (1994a)
	End9CRW8 (antisenso)	GGT CAC ATC TTA CAG CTT TAA CCT		
	VP7RV (antisenso)	TGC CAC CAY YTY TTC CA	923	Este estudo

Nota: “pb” significando “pares de bases”

4.8 REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO NUCLEOTÍDICO

Todos os fragmentos amplificados foram purificados utilizando-se o reagente *ExoSap-IT* (USB® Products Affymetrix, Cleveland, USA) para amostras que apresentaram banda única à visualização do gel de agarose, corado previamente com brometo de etídeo e submetido à luz ultravioleta (UV); ou o *kit Illustra FX Gel Extraction Kit* (GE Healthcare®, Little Chalfont, UK) para amostras que resultaram em bandas inespecíficas, além da alvo, de acordo com as instruções do fabricante. Após esta etapa, os produtos foram submetidos a

reações de sequenciamento utilizando-se o reagente *Big-Dye 3.1* (Applied Biosystems[®], Carlsbad, USA), cujas sequências foram definidas em equipamento *ABI-3500 Genetic Analyser* (Applied Biosystems[®], Carlsbad, USA), de acordo com instruções do fabricante.

A reação de sequenciamento para cada amostra purificada com o *kit Illustra FX Gel Extraction Kit* (GE Healthcare[®], Little Chalfont, UK) consistiu em dois diferentes tubos, contendo cada um deles 4 µL de *BigDye 3.1* (Applied Biosystems[®], Carlsbad, USA), 4 µL de 5x *Sequencing buffer* (Applied Biosystems[®], Carlsbad, USA), 5 pmol/ µL de cada primer senso ou antisenso e 11,5 µL do DNA alvo para uma reação final de 20 µL. Para as amostras purificadas com o reagente *ExoSap-IT* (USB[®] Products Affymetrix, Cleveland, USA), a reação de sequenciamento consistiu em dois diferentes tubos, contendo cada um deles 2 µL de *BigDye 3.1* (Applied Biosystems[®], Carlsbad, USA), 1,5 µL de 5x *Sequencing buffer* (Applied Biosystems[®], Carlsbad, USA), 5 pmol/ µL de cada primer senso ou antisenso e 6 µL do DNA alvo para uma reação final de 10 µL. Ambas as reações foram levadas ao termociclador *Eppendorf[®] Mastercycler Gradient* a 96°C/ 1 minuto, em seguida a 40 ciclos de 96°C/ 15 segundos, 50°C/ 15 segundos e 60°C/ 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, as soluções do produto *BigDye XTerminator Purification Kit* (Applied Biosystems[®], Carlsbad, USA) foram adicionadas a estas reações. Para os diferentes protocolos de sequenciamento com volume final de 20 µL e 10 µL, foram adicionados 90 µL e 45 µL da *SAMTM Solution* e 20 µL e 10 µL da *XTerminator Solution*, respectivamente. A seguir, as reações finais foram submetidas à homogenização em *Eppendorf[®] Thermomixer Comfort* por 30 minutos a 25°C e centrifugadas brevemente levando-as, por fim, ao sequenciador de nucleotídeos para processamento de acordo com as instruções do fabricante.

4.9 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS

De posse dos eletroferogramas, foi feita uma inspeção visual das sequências geradas para cada fita senso e antisenso através do aplicativo *FinchTV* v. 1.4.0. Posteriormente, foram editadas com o programa *Bioedit* v.7.0.5 (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* v.2.1 (LARKIN et al., 2007).

As sequências recuperadas do *Genbank*, usadas para a análise filogenética, acerca dos genes VP7 e VP4 encontram-se nas tabelas 1 e 2, respectivamente.

Tabela 1 - Sequências do gene VP7 de rotavírus, recuperadas do *Genbank*, utilizadas para a reconstrução da filogenia, segundo estirpe viral de rotavírus, *accession number*, genotipo, hospedeiro e referência - São Paulo - 2013

continuação				
Nome da estirpe de rotavírus	<i>Accession number</i>	Genotipo	Hospedeiro	Referência
Wa	K02033	G1	Humano	Matthijnssens et al. (2011)
P21-5	DQ629928	G1	Suíno	Matthijnssens et al. (2011)
CMP034	DQ534015	G2	Suíno	Matthijnssens et al. (2008a)
34461-4	AY766085	G2	Suíno	Matthijnssens et al. (2008a)
DS-1	AB118023	G2	Humano	Matthijnssens et al. (2011)
A131	L35055	G3	Suíno	Matthijnssens et al. (2008a)
CMP48/08	HQ268836	G3	Suíno	Okitsu et al. (2010)
A138	L35079	G3	Suíno	Chan-it et al. (2008)
AU-1	D86271	G3	Humano	Matthijnssens et al. (2011)
DC5544	FJ947513	G3	Humano	Matthijnssens et al. (2011)
RV3	FJ998278	G3	Humano	Matthijnssens et al. (2011)
PP-1	AF427124	G3	Bovino	Matthijnssens et al. (2011)

Tabela 1 - Sequências do gene VP7 de rotavírus, recuperadas do *Genbank*, utilizadas para a reconstrução da filogenia, segundo estirpe viral de rotavírus, *accession number*, genotipo, hospedeiro e referência - São Paulo - 2013

continuação				
Nome da estirpe de rotavírus	<i>Accession number</i>	Genotipo	Hospedeiro	Referência
BA222	GU827411	G3	Felino	Matthijnssens et al. (2011)
PAH136	GU296430	G3	Humano	Matthijnssens et al. (2011)
Cat2	EU708961	G3	Felino	Matthijnssens et al. (2011)
Gottfried	X06759	G4	Suíno	Matthijnssens et al. (2008a)
KJ44	DQ494393	G5	Bovino	Matthijnssens et al. (2008a)
KJ75	DQ494394	G5	Bovino	Matthijnssens et al. (2008a)
A34	L35059	G5	Suíno	Matthijnssens et al. (2008a)
134/04-15	DQ062572	G5	Suíno	Matthijnssens et al. (2008a)
344/04-1	DQ513658	G5	Suíno	Matthijnssens et al. (2008a)
HP140	DQ003293	G6	Suíno	Matthijnssens et al. (2008a)
HP113	DQ003292	G6	Suíno	Matthijnssens et al. (2008a)
BRV033	U62154	G6	Bovino	Matthijnssens et al. (2008a)
WC3	AY050272	G6	Bovino	Matthijnssens et al. (2008a)
UK	X00896	G6	Bovino	Matthijnssens et al. (2008a)
NCDV	M12394	G6	Bovino	Matthijnssens et al. (2008a)
RF	X65940	G6	Bovino	Matthijnssens et al. (2011)
Ty-3	AB080737	G7	Peru	Matthijnssens et al. (2011)
O	DQ838598	G8	Bovino	Matthijnssens et al. (2008a)
A5	D01054	G8	Bovino	Matthijnssens et al. (2008a)
69M	EF672560	G8	Humano	Matthijnssens et al. (2011)
US1205	AF060487	G9	Humano	Matthijnssens et al., (2008a)
WI61	EF672623	G9	Humano	Matthijnssens et al. (2008a)
B3458	EF990708	G9	Humano	Matthijnssens et al. (2008a)
F45	AB180970	G9	Humano	Matthijnssens et al. (2008a)
116E	FJ361209	G9	Humano	Matthijnssens et al. (2008a)
Mc323	D38053	G9	Humano	Matthijnssens et al. (2008a)
Mc345	D38055	G9	Humano	Matthijnssens et al. (2008a)

Tabela 1 - Sequências do gene VP7 de rotavírus, recuperadas do *Genbank*, utilizadas para a reconstrução da filogenia, segundo estirpe viral de rotavírus, *accession number*, genotipo, hospedeiro e referência - São Paulo - 2013

continuação

Nome da estirpe de rotavírus	<i>Accession number</i>	Genotipo	Hospedeiro	Referência
B223	X57852	G10	Bovino	Matthijnssens et al. (2008a)
A44	D01055	G10	Bovino	Matthijnssens et al. (2008a)
Lamb-NT	FJ031029	G10	Ovino	Matthijnssens et al. (2011)
YM	M23194	G11	Suíno	Matthijnssens et al. (2008a)
A253	L24163	G11	Suíno	Matthijnssens et al. (2011)
KTM368	GU199497	G11	Humano	Matthijnssens et al. (2011)
RU172	DQ204743	G12	Suíno	Matthijnssens et al. (2008a)
L26	M58290	G12	Humano	Matthijnssens et al. (2011)
RV161	DQ90550	G12	Humano	Matthijnssens et al. (2011)
CAU 195	EF059916	G12	Humano	Matthijnssens et al. (2011)
L338	JF712560	G13	Equino	Matthijnssens et al. (2011)
E403	JF712582	G14	Equino	Matthijnssens et al. (2011)
Hg18	AF237666	G15	Bovino	Matthijnssens et al. (2008a)
B383	FJ347116	G15	Bovino	Matthijnssens et al. (2011)
ETD_822	GQ79955	G16	Murino	Matthijnssens et al. (2011)
Ty-1	S58166	G17	Peru	Matthijnssens et al. (2011)
PO-13	D82979	G18	Pombo	Matthijnssens et al. (2011)
Ch-02v0002	FJ169861	G19	Frango	Matthijnssens et al. (2011)
Ecu534	EU805773	G20	Humano	Matthijnssens et al. (2011)
Azuk-1	AB454421	G21	Bovino	Matthijnssens et al. (2011)
Tu-03v0002E10	EU486973	G22	Peru	Matthijnssens et al. (2011)
Phea14246	FN39054	G23	Faisão	Matthijnssens et al. (2011)
Dai-10	AB513837	G24	Bovino	Matthijnssens et al. (2011)
KE4852	GU983676	G25	Morcego	Matthijnssens et al. (2011)
TJ4-1	AB605258	G26	Suíno	Matthijnssens et al. (2011)

Tabela 1 - Sequências do gene VP7 de rotavírus, recuperadas do *Genbank*, utilizadas para a reconstrução da filogenia, segundo estirpe viral de rotavírus, *accession number*, genotipo, hospedeiro e referência - São Paulo - 2013

conclusão				
Nome da estirpe de rotavírus	<i>Accession number</i>	Genotipo	Hospedeiro	Referência
SG33	AB621363	G27	<i>Petaurus breviceps</i>	Matthijnssens et al. (2011)

Tabela 2 - Sequências do gene VP4 de rotavírus, recuperadas do *Genbank*, utilizadas para a reconstrução da filogenia, segundo estirpe viral de rotavírus, *accession number*, genotipo, hospedeiro e referência - São Paulo - 2013

continuação				
Nome da estirpe de rotavírus	<i>Accession number</i>	Genotipo	Hospedeiro	Referência
A5	D13395	P[1]	Bovino	Matthijnssens et al. (2008a)
BRV033	U62155	P[1]	Bovino	Matthijnssens et al. (2008a)
O	DQ838596	P[1]	Bovino	Matthijnssens et al. (2008a)
NCDV	AB119636	P[1]	Bovino	Matthijnssens et al. (2008a)
KJ44	DQ494407	P[1]	Bovino	Matthijnssens et al. (2008a)
RF	U65924	P[1]	Bovino	Matthijnssens et al. (2011)
SA11-H96	DQ841262	P[2]	Macaco	Matthijnssens et al. (2011)
RUBV3	EF200553	P[3]	Bovino	Matthijnssens et al. (2008a)
K9	D14725	P[3]	Cachorro	Matthijnssens et al. (2011)
DS-1	AJ540227	P[4]	Humano	Matthijnssens et al. (2011)
GER1H-09	GQ414543	P[4]	Humano	Matthijnssens et al. (2011)
WC3	AY050271	P[5]	Bovino	Matthijnssens et al. (2008a)
UK	M22306	P[5]	Bovino	Matthijnssens et al. (2008a)
KJ75	DQ494408	P[5]	Bovino	Matthijnssens et al. (2008a)
Gottfried	M33516	P[6]	Suíno	Matthijnssens et al. (2008a)
ST3	L33895	P[6]	Humano	Matthijnssens et al. (2011)
RV161	DQ490548	P[6]	Humano	Matthijnssens et al. (2011)
RV176	DQ490554	P[6]	Humano	Matthijnssens et al. (2011)
CAU 195	EF059920	P[6]	Humano	Matthijnssens et al. (2011)

Tabela 2 - Sequências do gene VP4 de rotavírus, recuperadas do *Genbank*, utilizadas para a reconstrução da filogenia, segundo estirpe viral de rotavírus, *accession number*, genotipo, hospedeiro e referência - São Paulo - 2013

continuação				
Nome da estirpe de rotavírus	<i>Accession number</i>	Genotipo	Hospedeiro	Referência
CAU 214	EF059921	P[6]	Humano	Matthijnssens et al. (2011)
CRW8	L07888	P[7]	Suíno	Matthijnssens et al. (2008a)
YM	M63231	P[7]	Suíno	Matthijnssens et al. (2008a)
RU172	DQ204742	P[7]	Suíno	Matthijnssens et al. (2008a)
Wa	L34161	P[8]	Humano	Matthijnssens et al. (2011)
B4633	DQ146641	P[8]	Humano	Matthijnssens et al. (2011)
AU-1	D10970	P[9]	Humano	Matthijnssens et al. (2011)
T152	AB077766	P[9]	Humano	Matthijnssens et al. (2011)
69M	M60600	P[10]	Humano	Matthijnssens et al. (2011)
B223	D13394	P[11]	Bovino	Matthijnssens et al. (2008a)
A44	D13392	P[11]	Bovino	Matthijnssens et al. (2008a)
116E	L07934	P[11]	Humano	Matthijnssens et al. (2011)
E30	JF712575	P[12]	Equino	Matthijnssens et al. (2011)
HP140	DQ003291	P[13]	Suíno	Matthijnssens et al. (2008a)
HP113	DQ003290	P[13]	Suíno	Matthijnssens et al. (2008a)
ICB2212	AY124576	P[13]-like	Suíno	Chan-it et al. (2008)
ICB2191	AY124575	P[13]-like	Suíno	Chan-it et al. (2008)
JP35-7	AB176690	P[13]/P[22]-like	Suíno	Teodorooff et al. (2005)
JP13-3	AB176686	P[13]/P[22]-like	Suíno	Teodorooff et al. (2005)
A64	EF672563	P[14]	Humano	Matthijnssens et al. (2011)
BP1879	FN665680	P[14]	Humano	Matthijnssens et al. (2011)
Lamb-NT	FJ031027	P[15]	Ovino	Matthijnssens et al. (2011)
ETD_822	GQ479950	P[16]	Murino	Matthijnssens et al. (2011)
993-83	D16352	P[17]	Bovino	Matthijnssens et al. (2008a)
PO-13	AB009632	P[17]	Pombo	Matthijnssens et al. (2011)
L338	JF712558	P[18]	Equino	Matthijnssens et al. (2011)

Tabela 2 - Sequências do gene VP4 de rotavírus, recuperadas do *Genbank*, utilizadas para a reconstrução da filogenia, segundo estirpe viral de rotavírus, *accession number*, genotipo, hospedeiro e referência - São Paulo - 2013

conclusão				
Nome da estirpe de rotavírus	<i>Acession number</i>	Genotipo	Hospedeiro	Referência
4F	L10359	P[19]	Suíno	Matthijnssens et al. (2008a)
RMC321	AF523677	P[19]	Humano	Matthijnssens et al. (2011)
mani-97	GQ240618	P[19]	Humano	Matthijnssens et al. (2011)
NIV929893	DQ887060	P[19]	Humano	Matthijnssens et al. (2011)
EHP	U08424	P[20]	Murino	Matthijnssens et al. (2011)
Hg18	AF237665	P[21]	Bovino	Matthijnssens et al. (2008a)
160/01	AF526374	P[22]	Coelho	Matthijnssens et al. (2011)
CMP48/08	HQ268847	P[23]	Suíno	Okitsu et al. (2010)
34461-4	AY768809	P[23]	Suíno	Matthijnssens et al. (2008a)
A34	AY174094	P[23]	Suíno	Matthijnssens et al. (2011)
TUCH	AY596189	P[24]	Macaco	Matthijnssens et al. (2011)
Dhaka6	GU199520	P[25]	Humano	Matthijnssens et al. (2011)
KTM368	GU199495	P[25]	Humano	Matthijnssens et al. (2011)
134/04-15	DQ061053	P[26]	Suíno	Matthijnssens et al. (2008a)
CMP034	DQ534016	P[27]	Suíno	Matthijnssens et al. (2008a)
P21-5	DQ629926	P[27]	Suíno	Matthijnssens et al. (2008a)
Ecu534	EU805773	P[28]	Humano	Matthijnssens et al. (2011)
AzuK-1	AB454420	P[29]	Bovino	Matthijnssens et al. (2011)
Ch-02V0002	U486956	P[30]	Frango	Matthijnssens et al. (2011)
Ch-06V0661	EU486962	P[31]	Frango	Matthijnssens et al. (2011)
61/07	FJ492835	P[32]	Suíno	Matthijnssens et al. (2011)
Dai-10	AB513836	P[33]	Bovino	Matthijnssens et al. (2011)
FGP51	AB571047	P[34]	Suíno	Matthijnssens et al. (2011)
Tu-03V0002E10	EU486958	P[35]	Peru	Matthijnssens et al. (2011)

Foi definido um bloco consensual de análise para serem feitas as matrizes de identidade de nucleotídeos e de aminoácidos entre as amostras, mediante o *software Bioedit* v.7.0.5 (HALL, 1999).

As inferências filogenéticas foram realizadas mediante o uso do programa Mega versão 5 (TAMURA et al., 2011). As árvores geradas a partir das sequências nucleotídicas foram construídas pelo método de *neighbor-joining* através do modelo de substituição *maximum composite likelihood* para a região parcial de 543 nucleotídeos do gene codificador da VP7, e para a região parcial de 493 nucleotídeos do gene codificador da VP4 dos rotavírus, sendo também definidos os valores de “*bootstrap*” a partir de 1000 repetições, cujos valores maiores ou iguais a 50 foram apresentados próximos aos nós.

5 RESULTADOS

Os resultados baseados na metodologia definida para este trabalho estão descritos nos itens a seguir.

5.1 ANÁLISE *IN SILICO* DOS PRIMERS

A análise visual das regiões de hibridização dos *primers* acerca dos genes VP6 (VP6F e VP6R) e NSP5 (P1 e P2; P3 e P4) dos rotavírus do grupo A (Figuras 10 e 11) descritos por Iturriza-Gómara et al. (2002) e Salem et al. (2010), respectivamente, demonstrou que as regiões de anelamento dos últimos apresentam maior consenso, quando comparadas com os primeiros.

Em relação aos coronavírus, a análise acerca das regiões contempladas pelos *primers* descritos por Salem et al. (2010), direcionados aos gene M do PEDV (M1 e M2; M3 e M4) e S do TGEV (S2; S3 e S4), evidenciou que estas são altamente conservadas (Figuras 12, 13 e 14). Os fragmentos abrangidos pelos oligonucleotídeos iniciadores relatados por Paton et al. (1997) direcionados ao gene S do TGEV e PRCoV (F1121 e R1122) também mostraram alta identidade entre as sequências da literatura analisadas (Figuras 13 e 14).

No que tange aos *primers* descritos por Stephensen, Casebolt e Gangopadhyay (1999) (2Bp e 4Bm), observou-se que estes contemplam uma região altamente conservada entre diferentes amostras de coronavírus (Figura 15). Os oligonucleotídeos iniciadores relatados por Brandão et al. (2005) (CV2U e CV2L) evidenciaram alta identidade com o coronavírus bovino, pertencente ao gênero dos *Betacoronavirus* (Figura 15).

5.2 DIAGNÓSTICO DE ROTAVÍRUS E CORONAVÍRUS EM AMOSTRAS FECAIS

Das 218 suspensões fecais testadas pela *nested* RT-PCR, um total de 88 (40,37%) foi positivo para os rotavírus do grupo A. Em nenhuma das amostras do presente estudo foi evidenciada a infecção por coronavírus. Todas as granjas, exceto uma localizada na cidade de Leme, apresentaram pelo menos uma amostra fecal positiva para o rotavírus do grupo A.

Estão apresentados na tabela 3 e no gráfico 1 os dados de positividade dos rotavírus frente à técnica diagnóstica de *nested* RT-PCR, evidenciando a frequência de ocorrência deste micro-organismo, através da razão entre o número de amostras positivas e o número de amostras testadas nos diferentes municípios do estado de São Paulo.

Tabela 3 - Razão entre o número de amostras positivas para rotavírus e o número de amostras testadas nos diferentes municípios do Estado de São Paulo - São Paulo - 2013

Município	Número de amostras positivas/ número de amostras testadas (%)
Itapeva	9/18 (50)
Iracemópolis	2/16 (12,5)
Piedade	1/3 (33,33)
Pedra Bela	8/20 (40)
Limeira	2/14 (14,28)
Bragança Paulista	4/23 (17,39)
Boituva	5/17 (29,41)
Embu-guaçu	2/12 (16,67)
Ibiúna	11/20 (55)
Nova Odessa	8/10 (80)
Itu	36/57 (63,16)
Leme	0/8 (0)

Gráfico 1 - Amostras positivas para rotavírus e total de amostras testadas nos diferentes municípios do Estado de São Paulo – São Paulo - 2013

5.3 REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO NUCLEOTÍDICO

Foi possível definir a sequência parcial do gene codificador da VP7 em 24 amostras (das 27 submetidas à técnica) enquanto que para a VP4 obtiveram-se 34 sequências viáveis (de um total de 38 amostras). As sequências do gene codificador da VP7 e VP4 estão apresentado nos anexo A e anexo B, respectivamente.

5.4 ALINHAMENTOS E MATRIZES DE IDENTIDADE DAS SEQUÊNCIAS GERADAS

Na figura 19 está o alinhamento da sequência traduzida para aminoácidos do gene codificador da VP7 das amostras PGRV10 e PGRV12, provenientes de Ibiúna, das amostras PGRV19 e PGRV20, oriundas de Itapeva, e das amostras PGRV1, PGRV2, PGRV3, PGRV4, PGRV5, PGRV6, PGRV7, PGRV8 e PGRV9, originárias de Itú, geradas no presente estudo, e alinhadas com outras homólogas pertencentes ao mesmo genótipo G3 recuperadas do *Genbank* e utilizadas na elaboração da inferência filogenética. A região corresponde aos nucleotídeos 121 a 789, e aminoácidos 41 a 263 em relação à amostra padrão A131 (*accession number* L35055). Os aminoácidos 41 a 48 (Figura 19) representam 16,67% dos domínios hidrofóbicos do gene codificador da VP7 (Figura 3). A respectiva matriz de identidade em termos de nucleotídeos e aminoácidos consta no apêndice A.

Figura 19 – Alinhamento de um fragmento parcial de 223 aminoácidos traduzidos a partir do gene codificador da proteína VP7 de rotavírus suínos. O retângulo em vermelho representa 16,67% dos domínios hidrofóbicos da proteína

Os valores de similaridade máxima e mínima de nucleotídeos e de aminoácidos da região consensual das sequências de rotavírus G3 geradas neste estudo e frente às demais representativas deste mesmo genotipo de VP7 depositadas no *Genbank*, estão apresentadas no quadro 5.

Quadro 5 - Valores de similaridade máxima e mínima de nucleotídeos e de aminoácidos da região consensual das sequências de rotavírus geradas neste estudo, bem como frente às demais representativas do genotipo G3 de VP7 depositadas no *Genbank* - São Paulo - 2013

Similaridade	Nucleotídeos (máxima/mínima)	Aminoácidos (máxima/mínima)
Entre as sequências geradas neste estudo	100%: PGRV2/ Itú X PGRV4/ Itú PGRV5/ Itú X PGRV6/ Itú X PGRV7/ Itú	100%: PGRV2/ Itú X PGRV4/ Itú PGRV5/ Itú X PGRV6/ Itú X PGRV7/ Itú
	91,1%: PGRV10/ Ibiúna X PGRV1/ Itú X PGRV4/ Itú X PGRV8/ Itú X PGRV9/ Itú	92%: PGRV10/ Ibiúna X PGRV1/ Itú X PGRV8/ Itú X PGRV9/ Itú
Entre as sequências geradas neste estudo frente às demais G3 selecionadas do <i>Genbank</i>	89,4%: L35079/Porcine X PGRV12/ Ibiúna	95,6%: L35055/Porcine X PGRV19/ Boituva X PGRV20/ Boituva
	84,4%: GU296430/Feline X PGRV10/ Ibiúna	89,3%: GU296430/Feline X PGRV10/ Ibiúna

Na figura 20 está o alinhamento da sequência traduzida para aminoácidos do gene codificador da VP7 da amostra PGRV13, proveniente de Piedade, e das amostras PGRV14, PGRV15, PGRV16, PGRV17, PGRV18, PIGSP1, PIGSP2 e PIGSP3, oriundas de Itapeva, geradas no presente estudo, e alinhadas com outras homólogas pertencentes ao mesmo genótipo G5 recuperadas do *Genbank* e utilizadas na elaboração da inferência filogenética. A região corresponde aos nucleotídeos 55 a 627, e aminoácidos 16 a 206, tendo como referência a amostra padrão 344/04-1 (*accession number* DQ813658). Os aminoácidos 16 a 48 (Figura 20) representam 62,5% dos domínios hidrofóbicos do gene codificador da VP7 (Figura 3). A respectiva matriz de identidade em termos de nucleotídeos e aminoácidos consta no apêndice B.

Figura 20 – Alinhamento de um fragmento parcial de 191 aminoácidos traduzidos a partir do gene codificador da proteína VP7 de rotavírus suínos. O retângulo em vermelho representa 62,5% dos domínios hidrofóbicos da proteína

Fonte: Toniatti (2013)

Os valores de similaridade máxima e mínima de nucleotídeos e de aminoácidos da região consensual das sequências de rotavírus G5 geradas neste estudo e frente às demais representativas deste mesmo genotipo de VP7 depositadas no *Genbank*, estão apresentadas no quadro 6.

Quadro 6 - Valores de similaridade máxima e mínima de nucleotídeos e de aminoácidos da região consensual das sequências de rotavírus geradas neste estudo, bem como frente às demais representativas do genotipo G5 de VP7 depositadas no *Genbank* - São Paulo - 2013

Similaridade	Nucleotídeos (máxima/mínima)	Aminoácidos (máxima/mínima)
Entre as sequências geradas neste estudo	100%: PGRV16/ Itapeva X PGRV18/ Itapeva X PIGSP2/ Itapeva X PIGSP3/ Itapeva	100%: PGRV15/ Itapeva X PGRV16/ Itapeva X PGRV18/ Itapeva X PIGSP2/ Itapeva X PIGSP3/ Itapeva
	80,6%: PGRV13/ Piedade X PIGSP1/ Itapeva	86,3%: PGRV13/ Piedade X PIGSP1/ Itapeva
Entre as sequências geradas neste estudo frente às demais G5 selecionadas do <i>Genbank</i>	91,2%: DQ494394/Bovine X PGRV15/ Itapeva X PGRV16/ Itapeva X PGRV18/ Itapeva X PIGSP2/ Itapeva X PIGSP3/ Itapeva	94,2%: DQ813658/Porcine X PGRV13/Piedade
	82,5%: L35059/Porcine X PGRV13/ Itapeva	89%: DQ494393/Bovine X PIGSP1/ Itapeva

Na figura 21 está o alinhamento da sequência traduzida para aminoácidos do gene codificador da VP7 da amostra PGRV11, proveniente de Ibiúna, e da amostra PGRV21, oriunda de Boituva, geradas no presente estudo, e alinhadas com outras homólogas pertencentes ao mesmo genotipo G9 recuperadas do *Genbank* e utilizadas na elaboração da inferência filogenética. A região corresponde aos nucleotídeos 46 a 834, e aminoácidos 16 a 278 em relação à amostra padrão Mc345 (*accession number* D38055). Os aminoácidos 16 a 48 (Figura 21) representam 68,75% dos domínios hidrofóbicos do gene codificador da VP7 (Figura 3). A respectiva matriz de identidade em termos de nucleotídeos e aminoácidos consta no apêndice C.

Figura 21 – Alinhamento de um fragmento parcial de 263 aminoácidos traduzidos a partir do gene codificador da proteína VP7 de rotavírus suínos. O retângulo em vermelho representa 68,75% dos domínios hidrofóbicos da proteína

Fonte: Tonietti (2013)

Os valores de similaridade máxima e mínima de nucleotídeos e de aminoácidos da região consensual das sequências de rotavírus G9 geradas neste estudo e frente às demais representativas deste mesmo genotipo de VP7 depositadas no *Genbank*, estão apresentadas no quadro 7.

Quadro 7 - Valores de similaridade máxima e mínima de nucleotídeos e de aminoácidos da região consensual das sequências de rotavírus geradas neste estudo, bem como frente às demais representativas do genotipo G9 de VP7 depositadas no *Genbank* - São Paulo - 2013

Similaridade	Nucleotídeos (máxima/mínima)	Aminoácidos (máxima/mínima)
Entre as sequências geradas neste estudo	95,6%: PGRV11/ Boituva X PGRV21/ Ibiúna	98%: PGRV11/ Boituva X PGRV21/ Ibiúna
	95,6%: PGRV11/ Boituva X PGRV21/ Ibiúna	98%: PGRV11/ Boituva X PGRV21/ Ibiúna
Entre as sequências geradas neste estudo frente às demais G9 selecionadas do <i>Genbank</i>	93,1%: EF990708/Human X PGRV11/ Ibiúna D38053/Human X PGRV11/ Ibiúna	96,5%: EF990708/Human X PGRV21/ Boituva
	87,9%: EF672623/Human X PGRV11/ Ibiúna AB180970/Human X PGRV11/ Ibiúna	92%: D38055/Human X PGRV11/ Boituva X PGRV21/ Ibiúna

PGRV29/BOITUVA
 PGRV32/PEDRA BELA
 PGRV33/PEDRA BELA
 PGRV34/PEDRA BELA
 L33895/ST3/Human
 DQ490554/RV176/Human
 EF059920/CAU 195/Human
 EF059921/CAU 214/Human
 M33516/Gottfried/Porcine
 DQ490548/RV161/Human

30 40 50 60 70 80 90 100
 K N Q S V T I N G P F F A Q T N Y A P V T H S G E V N D S T T I E P V L D G P Y Q P T S F K P P D D Y W I L L N P T S Q Q I V L E G T N R I D V V W V A L L L
 E . . N K N N
 . . . N K N N
 . . . N K N N
 . . . S . N I R S N . V . . . K . I . . .
 . . . S . N N N N . V . . . K . I . . .
 . . . S . N N N N . V . . . N . I . . .
 . . . S . N N N N . V . . . N . I . . .
 . . . M 3 3 5 1 6 T R V N I N K G V F K . . . I . . .
 . . . S . N N N N V . . . K . I . . .

110 120 130 140 150 160 170 180
 E P H V T N Q S R Q Y T L F G E M K Q I T V E N S T K W K F F E M F R S N A S A E F Q H K R T L T S D T K L A G F L K H G G R V W T F H G E T P N A T T D Y S
 T N . N . . . N N
 T N . N . . . N N
 T N . N . . . N N
 T I . N . N . . . V . S F Y N S . . . H .
 T I . N . N . . . S V M . F Y N S . . . H .
 N . N . . . V N M . F Y N S . . . H .
 N . N . . . V N M . F Y N S . . . H .
 . . . Q R . P S . D . . . V . . . S D . . . N . N I D . L Q . P . . . T . . . N . . . H .
 T I . N . N . . . S V M . F Y N S . . . H .

190 200 210 220 230 240 250 260
 S T S N L S E I E T V I H T E F Y I I P R S Q E S K C K E Y I N T G L P P M Q N T R N I V P V A L S S R S V T H Q R A Q V N E D I I S K T S L W
 V Y
 V Y
 V . T S V Y
 V V S Y
 V Q S A Y
 V Q S A Y
 T . . . P D V . V N V I . Y . . .
 V V N Y

Fonte: Tonietti (2013)

Os valores de similaridade máxima e mínima de nucleotídeos e de aminoácidos da região consensual das sequências de rotavírus P[6] geradas neste estudo e frente às demais representativas deste mesmo genotipo de VP4 depositadas no *Genbank*, estão apresentadas no quadro 8.

Quadro 8 - Valores de similaridade máxima e mínima de nucleotídeos e de aminoácidos da região consensual das sequências de rotavírus geradas neste estudo, bem como frente às demais representativas do genotipo P[6] de VP4 depositadas no *Genbank* - São Paulo - 2013

Similaridade	Nucleotídeos (máxima/mínima)	Aminoácidos (máxima/mínima)
Entre as sequências geradas neste estudo	100%: PGRV33/ Pedra Bela X PGRV34/ Pedra Bela	100%: PGRV33/ Pedra Bela X PGRV34/ Pedra Bela
	94,2%: PGRV29/ Boituva X PGRV32/ Pedra Bela	94,4%: PGRV29/ Boituva X PGRV32/ Pedra Bela
Entre as sequências geradas neste estudo frente às demais P[6] selecionadas do <i>Genbank</i>	90,1%: L33895/Human X PGRV33/ Pedra Bela X PGRV34/ Pedra Bela	90,9%: DQ490554/Human X PGRV33/ Pedra Bela X PGRV34/ Pedra Bela DQ490548/Human X PGRV33/ Pedra Bela X PGRV34/ Pedra Bela
	80,4%: M33516/Porcine X PGRV32/ Pedra Bela	82,4%: M33516/Porcine X PGRV29/ Pedra Bela

Na figura 23 está o alinhamento da sequência traduzida para aminoácidos do gene codificador da VP4 das amostras PGRV1, PGRV2, PGRV3, PGRV4, PGRV5, PGRV6, PGRV7, PGRV8, PGRV9, PGRV22, PGRV23, PGRV26, PGRV27, PGRV28, PGRV31, provenientes de Itú, das amostras PGRV19, PGRV20 e PGRV21, oriundas de Boituva, e das amostras PGRV10, PGRV12 e PGRV25 de Ibiúna, geradas no presente estudo, e alinhadas com outras homólogas pertencentes ao mesmo genótipo P[13], P[13] (e/ou P[22]) recuperadas do *Genbank* e utilizadas na elaboração da inferência filogenética. A região corresponde aos nucleotídeos 181 a 723, e aminoácidos 61 a 241, tendo como referência a amostra padrão HP140 (*accession number* DQ003291). Os aminoácidos 93 a 208 (Figura 23) correspondem ao sítio de ligação do ácido siálico do gene codificador da VP4 (Figura 2). A respectiva matriz de identidade em termos de nucleotídeos e aminoácidos consta no apêndice E.

Figura 23 – Alinhamento de um fragmento parcial de 181 aminoácidos traduzidos a partir do gene codificador da proteína VP4 de rotavírus suínos. A região entre os colchetes corresponde ao sítio de ligação do ácido siálico

Os valores de similaridade máxima e mínima de nucleotídeos e de aminoácidos da região consensual das sequências de rotavírus P[13] (e/ou P[22]) geradas neste estudo e frente às demais representativas deste mesmo genotipo de VP4 depositadas no *Genbank*, estão apresentadas no quadro 9.

Quadro 9 - Valores de similaridade máxima e mínima de nucleotídeos e de aminoácidos da região consensual das sequências de rotavírus geradas neste estudo, bem como frente às demais representativas do genotipo P[13] (e/ou P[22]) de VP4 depositadas no *Genbank* - São Paulo - 2013

continuação		
Similaridade	Nucleotídeos (máxima/mínima)	Aminoácidos (máxima/mínima)
Entre as sequências geradas neste estudo	100%:	100%:
	PGRV1/ Itú X PGRV2/ Itú X PGRV3/ Itú X PGRV4/ Itú X PGRV5/ Itú X PGRV6/ Itú X PGRV7/ Itú X PGRV8/ Itú X PGRV9/ Itú X PGRV22/ Itú X PGRV23/ Itú X PGRV27/ Itú X PGRV28/ Itú X PGRV31/ Itú	PGRV1/ Itú X PGRV2/ Itú X PGRV3/ Itú X PGRV4/ Itú X PGRV5/ Itú X PGRV6/ Itú X PGRV7/ Itú X PGRV8/ Itú X PGRV9/ Itú X PGRV22/ Itú X PGRV23/ Itú X PGRV27/ Itú X PGRV28/ Itú X PGRV31/ Itú
	PGRV10/ Ibiúna X PGRV12/ Ibiúna X PGRV25/ Ibiúna	PGRV10/ Ibiúna X PGRV12/ Ibiúna X PGRV25/ Ibiúna
	PGRV20/ Boituva X PGRV21/ Boituva	PGRV20/ Boituva X PGRV21/ Boituva
	74,9%:	76,2%:
	PGRV10/ Ibiúna X PGRV1/ Itú X PGRV2/ Itú X PGRV3/ Itú X PGRV4/ Itú X PGRV5/ Itú X PGRV6/ Itú X PGRV7/ Itú X PGRV8/ Itú X PGRV9/ Itú X PGRV22/ Itú X PGRV23/ Itú X PGRV26/ Itú X PGRV27/ Itú X PGRV28/ Itú X PGRV31/ Itú	PGRV10/ Ibiúna X PGRV1/ Itú X PGRV2/ Itú X PGRV3/ Itú X PGRV4/ Itú X PGRV5/ Itú X PGRV6/ Itú X PGRV7/ Itú X PGRV8/ Itú X PGRV9/ Itú X PGRV22/ Itú X PGRV23/ Itú X PGRV26/ Itú X PGRV27/ Itú X PGRV28/ Itú X PGRV31/ Itú
	PGRV12/ Ibiúna X PGRV1/ Itú X PGRV2/ Itú X PGRV3/ Itú X	PGRV12/ Ibiúna X PGRV1/ Itú X PGRV2/ Itú X PGRV3/ Itú X

Quadro 9 - Valores de similaridade máxima e mínima de nucleotídeos e de aminoácidos da região consensual das sequências de rotavírus geradas neste estudo, bem como frente às demais representativas do genotipo P[13] (e/ou P[22]) de VP4 depositadas no *Genbank* - São Paulo - 2013

continuação		
Similaridade	Nucleotídeos (máxima/mínima)	Aminoácidos (máxima/mínima)
Entre as sequências geradas neste estudo	<p>74,9%</p> <p>PGRV12/ Ibiúna X PGRV1/ Itú X PGRV2/ Itú X PGRV3/ Itú X PGRV4/ Itú X PGRV5/ Itú X PGRV6/ Itú X PGRV7/ Itú X PGRV8/ Itú X PGRV9/ Itú X PGRV22/ Itú X PGRV23/ Itú X PGRV26/ Itú X PGRV27/ Itú X PGRV28/ Itú X PGRV31/ Itú</p>	<p>76,2%:</p> <p>PGRV12/ Ibiúna X PGRV1/ Itú X PGRV2/ Itú X PGRV3/ Itú X PGRV4/ Itú X PGRV5/ Itú X PGRV6/ Itú X PGRV7/ Itú X PGRV8/ Itú X PGRV9/ Itú X PGRV22/ Itú X PGRV23/ Itú X PGRV26/ Itú X PGRV27/ Itú X PGRV28/ Itú X PGRV31/ Itú</p>
Entre as sequências geradas neste estudo frente às demais P[13] (e/ou P[22]) selecionadas do <i>Genbank</i>	<p>89,6%:</p> <p>DQ003290/Porcine X PGRV1/ Itú X PGRV2/ Itú X PGRV3/ Itú X PGRV4/ Itú X PGRV5/ Itú X PGRV6/ Itú X PGRV7/ Itú X PGRV8/ Itú X PGRV9/ Itú X PGRV22/ Itú X PGRV23/ Itú X PGRV27/ Itú X PGRV28/ Itú X PGRV31/ Itú</p> <p>DQ003291/Porcine X PGRV1/ Itú X PGRV2/ Itú X PGRV3/ Itú X PGRV4/ Itú X PGRV5/ Itú X PGRV6/ Itú X PGRV7/ Itú X PGRV8/ Itú X PGRV9/ Itú X PGRV22/ Itú X PGRV23/ Itú X PGRV27/ Itú X PGRV28/ Itú X PGRV31/ Itú</p>	<p>92,2%:</p> <p>DQ003290/Porcine X PGRV1/ Itú X PGRV2/ Itú X PGRV3/ Itú X PGRV4/ Itú X PGRV5/ Itú X PGRV6/ Itú X PGRV7/ Itú X PGRV8/ Itú X PGRV9/ Itú X PGRV22/ Itú X PGRV23/ Itú X PGRV27/ Itú X PGRV28/ Itú X PGRV31/ Itú</p> <p>DQ003291/Porcine X PGRV1/ Itú X PGRV2/ Itú X PGRV3/ Itú X PGRV4/ Itú X PGRV5/ Itú X PGRV6/ Itú X PGRV7/ Itú X PGRV8/ Itú X PGRV9/ Itú X PGRV22/ Itú X PGRV23/ Itú X PGRV27/ Itú X PGRV28/ Itú X PGRV31/ Itú</p>

Quadro 9 - Valores de similaridade máxima e mínima de nucleotídeos e de aminoácidos da região consensual das sequências de rotavírus geradas neste estudo, bem como frente às demais representativas do genotipo P[13] (e/ou P[22]) de VP4 depositadas no *Genbank* - São Paulo - 2013

conclusão		
Similaridade	Nucleotídeos (máxima/mínima)	Aminoácidos (máxima/mínima)
Entre as sequências geradas neste estudo frente às demais P[13] (e/ou P[22]) selecionadas do <i>Genbank</i>	72,5%: AF526374/Rabbit X PGRV10/ Ibiúna X PGRV12/ Ibiúna X PGRV25/ Ibiúna	74%: AF526374/Rabbit X PGRV10/ Ibiúna X PGRV12/ Ibiúna X PGRV25/ Ibiúna AY124576/Porcine X PGRV10/ Ibiúna X PGRV12/ Ibiúna X PGRV25/ Ibiúna

Na figura 24 está o alinhamento da sequência traduzida para aminoácidos do gene codificador da VP4 da amostra PGRV11, proveniente de Ibiúna, da amostra PGRV13, oriunda de Piedade, das amostras PGRV24 e PGRV30, procedentes de Itú, e PGRV14, PGRV15, PGRV16, PGRV17, PGRV18 de Itapeva, geradas no presente estudo, e alinhadas com outras homólogas pertencentes ao mesmo genotipo P[23], recuperadas do *Genbank* e utilizadas na elaboração da inferência filogenética. A região corresponde aos nucleotídeos 247 a 753, e aminoácidos 83 a 251 em relação à amostra padrão CMP48/08 (*accession number* HQ268847). Os aminoácidos 93 a 208 (Figura 24) correspondem ao sítio de ligação do ácido siálico do gene codificador da VP4 (Figura 2). A respectiva matriz de identidade em termos de nucleotídeos e aminoácidos consta no apêndice F.

Figura 24 – Alinhamento de um fragmento parcial de 169 aminoácidos traduzidos a partir do gene codificador da proteína VP4 de rotavírus suínos. A região entre os colchetes corresponde ao sítio de ligação do ácido siálico

Fonte: Toniatti (2013)

Os valores de similaridade máxima e mínima de nucleotídeos e de aminoácidos da região consensual das sequências de rotavírus P[23] geradas neste estudo e frente às demais representativas deste mesmo genotipo de VP4 depositadas no *Genbank*, estão apresentadas no quadro 10.

Quadro 10 - Valores de similaridade máxima e mínima de nucleotídeos e de aminoácidos da região consensual das sequências de rotavírus geradas neste estudo, bem como frente às demais representativas do genotipo P[23] de VP4 depositadas no *Genbank* - São Paulo - 2013

Similaridade	Nucleotídeos (máxima/mínima)	Aminoácidos (máxima/mínima)
Entre as sequências geradas neste estudo	100%: PGRV14/ Itapeva X PGRV15/ Itapeva X PGRV16/ Itapeva X PGRV17/ Itapeva	100%: PGRV14/ Itapeva X PGRV15/ Itapeva X PGRV16/ Itapeva X PGRV17/ Itapeva X PGRV18/ Itapeva
	81%: PGRV30/ Itú X PGRV14/ Itapeva X PGRV15/ Itapeva X PGRV16/ Itapeva X PGRV17/ Itapeva	88,7%: PGRV30/ Itú X PGRV14/Itapeva X PGRV15/Itapeva/ X PGRV16/Itapeva X PGRV17/Itapeva X PGRV18/ Itapeva
Entre as sequências geradas neste estudo frente às demais P[23] selecionadas do <i>Genbank</i>	91,1%: AY174094/Porcine X PGRV11/ Ibiúna	95,2%: AY768809/Porcine X PGRV11/ Ibiúna
	82,6%: HQ268847/Porcine X PGRV30/ Itú	88,7%: HQ268847/Porcine X PGRV30/ Itú

Na figura 25 está o alinhamento de um bloco consensual (aminoácido 41 a 206, tendo como referência a amostra A131 de *accession number* L35055) das sequências traduzidas para aminoácidos do gene codificador da VP7 geradas no presente estudo. Os aminoácidos 41 a 48 (Figura 25) representam 16,67% dos domínios hidrofóbicos do gene codificador da VP7 (Figura 3).

Figura 25 – Alinhamento de um bloco consensual de 166 aminoácidos traduzidos a partir do gene codificador da proteína VP7 das sequências parciais de rotavírus suínos gerados no presente estudo. O retângulo em vermelho representa 16,67% dos domínios hidrofóbicos da proteína

Fonte: Toniatti (2013)

O alinhamento de um bloco consensual (aminoácido 83 a 241, tendo como referência a amostra HP140 de *accession number* DQ003291) das sequências traduzidas para aminoácidos do gene codificador da VP4, geradas no presente estudo, demonstrou regiões de inserção/deleção destacadas por retângulos pretos (Figura 26). Os aminoácidos 93 a 208 (Figura 26) correspondem ao sítio de ligação do ácido siálico do gene codificador da VP4 (Figura 2).

Figura 26 – Alinhamento do bloco consensual de 159 aminoácidos traduzidos a partir do gene codificador da proteína VP4 das sequências parciais de rotavírus suínos gerados no presente estudo. Os retângulos em preto representam regiões de inserção ou deleção de aminoácidos. A região entre os colchetes corresponde ao sítio de ligação do ácido siálico

5.5 INFERÊNCIA FILOGENÉTICA A PARTIR DAS SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS

A árvore filogenética referente ao fragmento parcial (543 nucleotídeos) dos nucleotídeos codificadores da VP7 dos rotavírus detectados no presente estudo juntamente com sequências representativas dos demais genótipos recuperadas do *Genbank* estão apresentadas na figura 27.

Quanto ao fragmento de 493 nucleotídeos do gene codificador da VP4, a inferência filogenética está apresentada na figura 28, juntamente com outras amostras representativas de diferentes genótipos de rotavírus.

Os números próximos a cada nó representam os valores de “*bootstrap*” (1000 repetições) e a escala representa o número de substituições/sítio.

Figura 27 - Árvore filogenética construída com o método de *neighbor-joining* através do modelo de substituição *maximum composite likelihood* (Software *Mega v. 5*) para a região parcial (543 nucleotídeos) do gene codificador da proteína VP7 dos rotavírus. As amostras apresentam a identificação *accession number*/ amostra/ hospedeiro. Os números próximos a cada nó representam os valores de 1000 repetições de “*bootstrap*”, tendo sido demonstrados apenas aqueles superiores a 50%. A escala representa o número de substituições/sítio. As amostras deste estudo estão precedidas por um quadrado preto

O quadro 11 representa os diferentes genótipos de rotavírus caracterizados neste estudo acerca do gene VP7.

Quadro 11 – Relação dos municípios de origem das amostras, respectivos genótipos G e tamanho do fragmento do gene sequenciado - São Paulo – 2013

continuação

Amostra	Município	Genótipo	Fragmento Sequenciado
PGRV1	Itú/SP	G3	932 nt
PGRV2	Itú/SP	G3	929 nt
PGRV3	Itú/SP	G3	708 nt
PGRV4	Itú/SP	G3	777 nt
PGRV5	Itú/SP	G3	927 nt
PGRV6	Itú/SP	G3	937 nt
PGRV7	Itú/SP	G3	921 nt
PGRV8	Itú/SP	G3	910 nt
PGRV9	Itú/SP	G3	929 nt
PGRV10	Ibiúna/ SP	G3	897 nt
PGRV11	Ibiúna/ SP	G9	956 nt
PGRV12	Ibiúna/ SP	G3	978 nt
PGRV13	Piedade/ SP	G5	850 nt
PGRV14	Itapeva/ SP	G5	624 nt
PGRV15	Itapeva/ SP	G5	697 nt
PGRV16	Itapeva/ SP	G5	884 nt
PGRV17	Itapeva/ SP	G5	928 nt
PGRV18	Itapeva/ SP	G5	966 nt
PGRV19	Boituva/SP	G3	833 nt
PGRV20	Boituva/SP	G3	821 nt
PGRV21	Boituva/SP	G9	836 nt
PIGSP1	Itapeva/ SP	G5	618 nt
PIGSP2	Itapeva/ SP	G5	771 nt

Quadro 11 – Relação dos municípios de origem das amostras, respectivos genótipos G e tamanho do fragmento do gene sequenciado - São Paulo – 2013

conclusão			
Amostra	Município	Genótipo	Fragmento Sequenciado
PIGSP3	Itapeva/ SP	G5	819 nt

Nota: “nt” significando “nucleotídeos”

O quadro 12 representa os diferentes genótipos de rotavírus caracterizados neste estudo acerca do gene VP4.

Quadro 12 – Relação dos municípios de origem das amostras, respectivos genótipos P e tamanho do fragmento do gene sequenciado - São Paulo - 2013

continuação			
Amostra	Município	Genótipo	Fragmento Sequenciado
PGRV1	Itú/SP	P[13] (e/ou P[22])	739 nt
PGRV2	Itú/SP	P[13] (e/ou P[22])	724 nt
PGRV3	Itú/SP	P[13] (e/ou P[22])	767 nt
PGRV4	Itú/SP	P[13] (e/ou P[22])	748 nt
PGRV5	Itú/SP	P[13] (e/ou P[22])	763 nt
PGRV6	Itú/SP	P[13] (e/ou P[22])	764 nt
PGRV7	Itú/SP	P[13] (e/ou P[22])	745 nt
PGRV8	Itú/SP	P[13] (e/ou P[22])	752 nt
PGRV9	Itú/SP	P[13] (e/ou P[22])	790 nt
PGRV10	Ibiúna/ SP	P[13] (e/ou P[22])	777 nt
PGRV11	Ibiúna/ SP	P[23]	600 nt
PGRV12	Ibiúna/ SP	P[13] (e/ou P[22])	672 nt
PGRV13	Piedade/ SP	P[23]	801 nt
PGRV14	Itapeva/ SP	P[23]	576 nt
PGRV15	Itapeva/ SP	P[23]	696 nt
PGRV16	Itapeva/ SP	P[23]	720 nt

Quadro 12 – Relação dos municípios de origem das amostras, respectivos genótipos P e tamanho do fragmento do gene sequenciado - São Paulo - 2013

conclusão			
Amostra	Município	Genótipo	Fragmento Sequenciado
PGRV17	Itapeva/ SP	P[23]	759 nt
PGRV18	Itapeva/ SP	P[23]	603 nt
PGRV19	Boituva/SP	P[13] (e/ou P[22])	767 nt
PGRV20	Boituva/SP	P[13] (e/ou P[22])	765 nt
PGRV21	Boituva/SP	P[13] (e/ou P[22])	754 nt
PGRV22	Itú/SP	P[13] (e/ou P[22])	768 nt
PGRV23	Itú/SP	P[13] (e/ou P[22])	705 nt
PGRV24	Itú/SP	P[23]	635 nt
PGRV25	Ibiúna/ SP	P[13] (e/ou P[22])	669 nt
PGRV26	Itú/SP	P[13] (e/ou P[22])	653 nt
PGRV27	Itú/SP	P[13] (e/ou P[22])	768 nt
PGRV28	Itú/SP	P[13] (e/ou P[22])	637 nt
PGRV29	Boituva/SP	P[6]	829 nt
PGRV30	Itú/SP	P[23]	730 nt
PGRV31	Itú/SP	P[13] (e/ou P[22])	585 nt
PGRV32	Pedra Bela/ SP	P[6]	714 nt
PGRV33	Pedra Bela/ SP	P[6]	773 nt
PGRV34	Pedra Bela/ SP	P[6]	766 nt

Nota: “nt” significando “nucleotídeo

Foi possível caracterizar 21 amostras para ambos os genótipos (G e P). O quadro 13 demonstra as amostras caracterizadas para os genótipos G e P e os respectivos municípios.

Quadro 13 – Relação dos municípios de origem das amostras e respectivos genótipos P e G. São Paulo, 2013

Amostra	Município	Genótipo G	Genótipo P
PGRV1	Itú/SP	G3	P[13] (e/ou P[22])
PGRV2	Itú/SP	G3	P[13] (e/ou P[22])
PGRV3	Itú/SP	G3	P[13] (e/ou P[22])
PGRV4	Itú/SP	G3	P[13] (e/ou P[22])
PGRV5	Itú/SP	G3	P[13] (e/ou P[22])
PGRV6	Itú/SP	G3	P[13] (e/ou P[22])
PGRV7	Itú/SP	G3	P[13] (e/ou P[22])
PGRV8	Itú/SP	G3	P[13] (e/ou P[22])
PGRV9	Itú/SP	G3	P[13] (e/ou P[22])
PGRV10	Ibiúna/ SP	G3	P[13] (e/ou P[22])
PGRV11	Ibiúna/ SP	G9	P[23]
PGRV12	Ibiúna/ SP	G3	P[13] (e/ou P[22])
PGRV13	Piedade/ SP	G5	P[23]
PGRV14	Itapeva/ SP	G5	P[23]
PGRV15	Itapeva/ SP	G5	P[23]
PGRV16	Itapeva/ SP	G5	P[23]
PGRV17	Itapeva/ SP	G5	P[23]
PGRV18	Itapeva/ SP	G5	P[23]
PGRV19	Boituva/SP	G3	P[13] (e/ou P[22])
PGRV20	Boituva/SP	G3	P[13] (e/ou P[22])
PGRV21	Boituva/SP	G9	P[13] (e/ou P[22])

Nota: “nt” significando “nucleotídeos”

6 DISCUSSÃO

Na presente investigação, denotou-se a importância dos rotavírus do grupo A na gênese da diarreia em suínos no Estado de São Paulo. A caracterização nos genótipos G e P dos rotavírus detectados visou à ampliação dos conhecimentos acerca dos aspectos moleculares destes genes. Foram encontrados tanto genótipos comuns, como outros pouco relatados na espécie suína.

Considerando que a VP4 e VP7 são alvos de anticorpos neutralizantes e tenham diferentes níveis de conservação nucleotídica (TANIGUCHI; URASAWA, 1995), o conhecimento da variabilidade genotípica é essencial para o desenvolvimento e utilização de vacinas para rotavírus (DENNEHY, 2008), já que este agente infeccioso conta com algumas características que favorecem sua marcante diversidade, entre elas, uma relativa resistência do vírus às condições ambientais e uma variação de hospedeiros, ou mesmo a possibilidade de infecções simultâneas de diferentes sorotipos em um mesmo indivíduo (GOUVEA; BRANTLY, 1995; BOK et al., 2001; PARRA et al., 2004). Estas características concordam com o fenômeno de *quasispécies*, o qual ocorre em populações de vírus RNA, como os rotavírus e coronavírus, este último não detectado no presente estudo. Gouvea e Brantly (1995) sugerem que este fenômeno ocorre devido ao mecanismo de evolução destes vírus quando imposto a pressões de seleção do meio ambiente e do hospedeiro infectado por eles. Isto explica novos achados epidemiológicos e resultados controversos nos estudos da eficácia de vacinas que tem como alvo esses agentes virais.

As reações de extração de RNA, RT e PCR apresentaram-se dentro do esperado. Todas as amostras fecais, além dos padrões positivos, apresentaram ao gel de agarose, nas condições previamente descritas, bandas compatíveis com a metodologia de Paton et al. (1997), Stephensen, Casebolt e Gangopadhyay (1999), Brandão et al. (2005) e Salem et al. (2010). Os controles negativos empregados nas reações não evidenciaram quaisquer bandas à visualização do gel.

A adoção da estratégia de realizar a reação com *primers* randômicos (ITURRIZA-GÓMARA et al., 1999) proporcionou uma economia de tempo e reagentes, possibilitando a realização de várias reações de PCR visando diferentes agentes e/ou genes.

A análise *in silico* dos primers a serem utilizados neste estudo (Figuras 10, 11, 12, 13, 14 e 15) teve a finalidade de pesquisar sequências de oligonucleotídeos iniciadores que contemplassem especificamente a diversidade de amostras suínas, e com isso minimizar a possibilidade de geração de resultados do tipo falso-negativos, devido à não hibridização dos primers com seus respectivos sítios.

No que diz respeito à seleção dos *primers*, visando à triagem de amostras para rotavírus, Iturriza-Gómara et al. (2000) concluíram em sua pesquisa a existência de mutações no gene codificador da VP6, e evidências do envolvimento dele na ocorrência de reestruturações deste vírion, relacionada com mudanças nas sequências de aminoácidos do agente viral. Nesse sentido, a utilização dos oligonucleotídeos iniciadores descritos por Salem et al. (2010) (Quadro 2 e Figura 11) ao invés daqueles descritos por Iturriza-Gómara et al. (2000) (Quadro 2 e Figura 10) para a detecção das rotavíroses suínas do grupo A teve como objetivo obter maior sensibilidade diagnóstica nos resultados de RT-PCR, visto que a região de anelamento dos *primers* acerca das sequências do gene codificador da NSP5 apresentou maior identidade quando comparadas ao gene codificador da VP6.

Foi detectada a ocorrência de rotavírus do grupo A em 91,6% dos municípios amostrados (11/12 municípios) e 40,37% (88/218) do total de amostras processadas (Tabela 3 e Gráfico 1) pela *multiplex nested* RT-PCR. A frequência obtida mostrou-se próxima aos 41% (34/83) descrito por Salem et al. (2010) na Rússia, que utilizaram uma *multiplex nested* RT-PCR, tal como no presente estudo. No entanto, superou àquelas relatadas por Song et al. (2006), de 10,8% (17/157) na Coreia, pelo emprego de uma *multiplex* RT-PCR; e por Linares et al. (2009), de 28,3% (193/681) no Brasil, por meio do uso da técnica de PAGE.

As reações de genotipagem de rotavírus desenvolvidas por Gouvea, Santos e Timenetsky (1994a,b) representaram um grande avanço na caracterização de amostras circulantes em animais, mas dado o crescente número de depósitos de novas sequências nucleotídicas, aliado à definição de novos genotipos e a grande quantidade de amostras não tipificadas, adotamos a estratégia de sequenciamento direto a partir do produto da primeira amplificação por PCR dos genes codificadores da VP4 e VP7.

No que diz respeito à filogenia de um fragmento do gene codificador da VP7 pudemos observar a ocorrência dos genótipos G3, G5 e G9. O primeiro e o último, por sua vez, não são contemplados no conjunto de *primers* de Gouvea, Santos e Timenetsky (1994a), o que levaria a conclusão de “amostra não tipificada”, demonstrando que a abordagem adotada resolveu esta questão. A identidade máxima de aminoácidos das amostras geradas neste estudo em relação às demais selecionadas do *Genbank* para os genótipos G3 e G5 foi com uma estirpe suína (Quadros 5 e 6 e Apêndices A e B). Tal resultado guarda concordância com Barreiros et al. (2003), Chan-it et al (2008) e Gregori et al. (2009), que descreveram estes genótipos em suínos.

Alfieri et al. (1996) detectaram o genótipo G5, no Brasil, por meio do estudo de sequências rotavirais provenientes de crianças desde a década de 80. Estes autores mostraram a hibridização do RNA tanto para a estirpe humana Wa, como para linhagens originadas de suínos, evidenciando a ocorrência de rearranjos entre os vírions das duas espécies. Matthijnssens et al. (2008b) demonstraram uma estrita relação evolucionária entre os rotavírus de origem humana Wa e aqueles originados da espécie suína.

A similaridade máxima de aminoácidos das amostras geradas neste estudo para o genótipo G9, comparando-se com aquelas selecionadas do *Genbank* foi com uma estirpe humana (Quadro 7 e Apêndice C). Isto concorda com Zeller et al. (2012) e Shi et al. (2012), que evidenciaram especificidades suínas em relação ao rotavírus G9, descrito em humanos. Teodoroff et al. (2005) também descreveram a predominância desse genótipo em suínos no Japão, e também a proximidade genética destes com estirpes humanas.

Tivemos três diferentes genótipos P detectados P[6], P[13] (e/ou P[22]) e P[23]. À semelhança do raciocínio anterior, os dois últimos genótipos também não estão contemplados no conjunto de *primers* descritos por Gouvea, Santos e Timenetsky (1994b), o que também levaria à geração de “amostras não tipificadas”.

As amostras P[6] resultantes do presente estudo evidenciaram identidade máxima com duas estirpes humanas (Quadro 8 e Apêndice D). Tal fato guarda concordância com a literatura. Na Europa, Bányai et al. (2004) e Martella et al. (2006, 2008) identificaram rotavírus humanos do grupo A semelhantes ao vírion de origem suína genotipados como P[6]. Este mesmo genótipo, apresentando similaridade com as sequências de porcos, já estabelecidas, foi observado por Esona et al. (2009), Ahmed, Anh e Nakagomi (2007), Hwang

et al. (2012) e Zeller et al. (2012) em crianças da África, Ásia, Bélgica e Taiwan, respectivamente.

As amostras de genotipo P[13] (e/ou P[22]) deste estudo demonstraram maior identidade de aminoácidos com duas estirpes suínas (Quadro 9 e Apêndice E). Segundo Ghosh et al. (2007), amostras de genotipo P[13] foram apenas detectadas em porcos. Teodoroff et al. (2005) relataram o genotipo P[13] (e/ou P[22]) em suínos.

A denominação do genotipo como P[13] (e/ou P[22]) se explica pelo fato de que a estirpe P[13] e a P[22], esta última designada como 160/01 e encontrada em coelho, apresentam proximidade filogenética (Figura 28) (TEODOROFF et al., 2005).

No que tange às amostras P[23] resultantes do presente estudo, quando comparadas com as estirpes selecionadas do *Genbank*, apresentaram maior similaridade de aminoácidos com uma estirpe suína (Quadro 10 e Apêndice F). Okitsu et al. (2011) descreveram tal genotipo como o predominante em criações na Tailândia, e Shi et al. (2012) isolaram este mesmo genotipo de um suíno na China.

Das 21 amostras caracterizadas para ambos os genotipos (G e P), uma proveniente da cidade de Ibiúna foi caracterizada como G9P[23] (Quadro 13), guardando concordância com o estudo de Shi et al. (2012) na China. Entre o restante, uma foi caracterizada como G9P[13] (e/ou P[22]), 13 como G3P[13] (e/ou P[22]) e seis como G5P[23] (Quadro 13). Miyazaki et al. (2011) detectaram a primeira combinação em um surto no Japão. Chan-it et al. (2008) descreveram a ocorrência de P[13] *like* com o genotipo G3 em suínos.

No entanto, até o presente, não foram encontrados relatos da combinação G5P[23], detectada nos municípios de Itapeva e Piedade.

Os municípios de Ibiúna e Boituva apresentaram dois genotipos para VP7 (G3 e G9) (Quadro 11), e as cidades de Ibiúna e Itú evidenciaram dois genotipos para VP4 (P[13] (e/ou P[22]) e P[23]) (Quadro 12). Tanto a combinação G9P[23], como a G3P[13] (e/ou P22) foram detectadas em Ibiúna. Foi possível observar a ocorrência da cocirculação de genotipos na mesma granja, como já relatado por Gregori et al. (2009).

A topologia da árvore filogenética (Figuras 27 e 28) aliada aos dados presentes nas diferentes matrizes de identidade (Quadros 5, 6, 7, 8, 9 e 10 e Apêndices A, B, C, D, E e F) e nos alinhamentos das sequências traduzidas para aminoácidos das amostras geradas no

presente estudo com outras homólogas pertencentes ao mesmo genotipo (Figuras 19, 20, 21, 22, 23 e 24) sugerem ainda uma diversidade intragenotípica tanto em termos de VP7 quanto de VP4, o que abre perspectivas de maior aprofundamento do estudo destes genes aliado aos dados de patogenia e proteção vacinal.

Com efeito, as árvores geradas a partir dos fragmentos mantiveram a diferenciação genotípica, inclusive suportadas por elevados valores de “*bootstrap*” (Figuras 27 e 28).

A região sequenciada do gene codificador da VP7 neste estudo, traduzida putativamente para aminoácidos (Figuras 19, 20 e 21), proporcionou a segregação filogenética dos genotipos descritos na literatura (Tabela 1). Tal fragmento está relacionado com uma região do sítio de ligação com o cálcio e com os dois domínios hidrofóbicos (H1 e H2) da proteína (GREEN et al., 1988; NISHIKAWA et al., 1989), tal como representado na figura 3.

Confrontando-se a região das sequências, traduzidas putativamente para aminoácidos, contemplada pela análise filogenética das sequências do gene codificador da VP4 (Figuras 22, 23 e 24) com a representação esquemática deste na figura 2, conforme Estes (2001) e Tihova et al. (2011), pode-se inferir que a região do gene que proporcionou o agrupamento das sequências deste estudo e daquelas representativas de rotavírus, recuperadas do *Genbank*, nos respectivos genotipos relacionados a este gene (Tabela 2) está em uma localização variável da VP8*, onde se localizam os sítios de ligação do ácido siálico (Figura 2), e segundo Mackow et al. (1988), é uma região que fica mais exposta na partícula viral e conta com uma grande diversidade de sítios de ligação dos anticorpos monoclonais, o que poderia explicar as regiões de diversidade nas sequências dessa região.

Conforme Haselhorst et al. (2009) e Tihova et al. (2011) o ácido siálico não é essencial para que o rotavírus consiga se replicar, mas ele confere maior eficácia ao processo de infecção pelo micro-organismo.

No que se refere aos alinhamentos das sequências geradas neste estudo (Figuras 25 e 26), pode-se evidenciar que as amostras genotipadas como P[13] (e/ou P[22]) e P[23] apresentaram uma inserção/deleção de aminoácidos se comparadas àquelas pertencentes ao genotipo P[6]. Ela está representada pelo primeiro retângulo na figura 26, onde as sequências não pertencentes a este último genotipo apresentam uma treonina ou valina ou alanina na posição 133 tendo como referência a amostra HP140 de *acession number* DQ003291. Tendo esta mesma referência, as amostras de genotipo P[13] (e/ou P[22]) demonstraram duas

inserções/ deleções em relação às P[6] e P[23], que apresentam uma prolina e uma glicina nas posições 186 e 190, respectivamente. Não há relatos dessas inserções/ deleções até o momento.

Dos 56 produtos de amplificação por PCR (utilizando-se os *primers* sCon3 e Con2; e sBeg9 e End9CRW8), foi possível, obter 30 sequências viáveis para análise do gene codificador da VP4 e 19 referentes à VP7. Os nove produtos de amplificação por PCR (utilizando-se os *primers* sCon3 e VP4RV; e sBeg9 e VP7RV) submetidos ao sequenciamento foram todos viáveis, resultando em mais cinco sequências para VP7, provenientes das cidades de Boituva e Itapeva; e mais quatro sequências para VP4, oriundas de Boituva e Pedra Bela.

Atribuímos a inviabilidade do sequenciamento de quatro amostras para o gene VP4 e cinco para VP7 (utilizando-se os *primers* sCon3 e Con2; e sBeg9 e End9CRW8) a fatores relacionados principalmente à quantidade de DNA presente na amostra e à purificação insatisfatória dos produtos submetidos à reação de sequenciamento. A não amplificação pela RT-PCR das amostras positivas para rotavírus de determinados municípios pela *multiplex nested* RT-PCR (Embú-Guaçu, Iracemópolis, Limeira, Nova Odessa e Bragança Paulista) não ter tido êxito tanto para VP7, como para VP4 deve ser considerada pelo fato de que a reação utilizada para a triagem das amostras (*nested* RT-PCR) apresenta sensibilidade analítica maior do que a reação de RT-PCR realizada para o sequenciamento e genotipagem das amostras. A etapa de reamplificação, contemplada pela reação de *nested* RT-PCR favorece a detecção do cDNA, mesmo quando este se encontra em pequenas concentrações na amostra testada (HUSAIN et al., 1995; BUESA et al., 1996).

Com relação à amplificação do gene codificador da VP4 dos rotavírus optamos por utilizar o *primer* Con3 descrito por Gouveia, Santos e Timenetsky (1994b), mas modificado pela exclusão das quatro primeiras bases da porção 5' da sequência (Figura 18 e Quadro 4), e o *primer* VP4RV para determinadas amostras que não amplificavam com o Con2, descrito por Gouveia, Santos e Timenetsky (1994b). No que tange à amplificação do gene codificador da VP7 dos rotavírus, optamos por utilizar o *primer* VP7RV para algumas amostras que não amplificavam com os *primers* End9CRW8, End9 e End9UK, descritos por Gouveia, Santos e Timenetsky (1994a). Dados preliminares dos alinhamentos de diversas amostras suínas depositadas no *Genbank* demonstraram grande variabilidade nestas posições, razão pela qual optamos por suprimi-la (sCon3 na posição 15 a 36 nucleotídeos) ou modificá-la (posição 814 a 839 nucleotídeos para VP4RV, e 907 a 923 para VP7RV), de modo a ganhar uma maior

sensibilidade diagnóstica. Considerando que os padrões e outras amostras previamente triadas como positivas foram amplificadas com estes *primers*, podemos supor que estejam funcionando adequadamente.

O fato de que foram obtidas mais nove sequências que não amplificavam com aqueles oligonucleotídeos iniciadores descritos na literatura (GOUVEIA; SANTOS; TIMENETSKY, 1994a,b), demonstra que a utilização dos novos *primers* (sCon3, VP4RV e VP7RV) trouxe vantagens em relação ao diagnóstico molecular de rotavírus, visto que, com elevada frequência, novas sequências estão sendo registradas no banco de genes, trazendo novas informações sobre possíveis alvos para a detecção de micro-organismos. Além disso, os RNA vírus possuem altas taxas de mutação, sendo desejável o desenvolvimento de técnicas baseadas em sequências atuais.

No que concerne à pesquisa de coronavírus, os *primers* utilizados para o diagnóstico deste agente viral abrangeram tanto as coronaviroses específicas (Quadro 2 e Figuras 12, 13 e 14) da espécie suína que podem ser encontradas nas fezes desses animais (PEDV, TGEV e PRCoV), como todas aquelas que causam doença em outros hospedeiros com o uso dos oligonucleotídeos iniciadores 2Bp e 4Bm (Quadro 2 e Figura 15). O uso destes *primers* teve o intuito de contemplar os diferentes gêneros dos coronavírus, visto que estes são direcionados à região ORF1b, a qual é altamente conservada em diferentes amostras desse vírus. Este método de diagnóstico foi realizado em paralelo, visto que já foi observada a presença de outros gêneros de coronavírus em suínos. Portanto, tal espécie pode se comportar epidemiologicamente como portador ou reservatório de coronavírus de outras espécies.

Chen et al. (2005) isolaram um coronavírus associado ao SARS-CoV de um suíno durante um inquérito visando determinar os possíveis reservatórios. Entretanto, as análises epidemiológicas e de sequenciamento indicaram que o suíno havia sido infectado por SARS-CoV de origem humana.

Embora não haja relatos de BCoV na espécie suína, em vista da possibilidade de coabitação de porcos e bovinos, o emprego dos oligonucleotídeos iniciadores CV2U e CV2L (BRANDÃO et al., 2005) (Quadro 2 e Figura 15) teve a finalidade de pesquisar *Betacoronavirus* nos hospedeiros suínos, assegurando um menor limiar de detecção ao teste.

Alguns coronavírus específicos de outro hospedeiros, como a estirpe humana 229E, o CCoV, o FIPV e o Coronavírus Felino Entérico (FeCoV) apresentam o mesmo receptor de

adesão à célula (APN) que o TGEV e o PRCoV, além de outros, cujo receptor celular ainda não foi determinado, que é o caso do SDAV, IBV e o TCoV (WEISS; NAVAS-MARTIN, 2005; PERLMAN; NETLAND, 2009). O fato de que determinados coronavírus apresentam o mesmo receptor de adesão celular é um fator predisponente para que haja adesão, penetração e replicação destes vírus em células de hospedeiros que não sejam específicos a ele.

No que diz respeito à ausência do TGEV e do PRCoV nas amostras analisadas, está de acordo com um estudo anterior de Brentano et al. (2002), que realizaram a técnica de soroneutralização de 2675 soros. Caso contrário, poderia se esperar ao menos relatos de manifestações clínicas destes vírus, e alta morbidade, dada as características do agente, principalmente do TGEV (PEMBERTON, 1999). Uma investigação sobre as características relacionadas à sanidade dos locais, onde se alojavam os animais, não foi realizada, não sendo possível falar sobre o sistema de vigilância sanitária.

Assim como observado neste estudo, até o momento não há relatos de PEDV no Brasil. No entanto, Song et al (2006) e Jung et al. (2007) já descreveram a coinfecção deste micro-organismo com o rotavírus do grupo A em suínos na Coreia; e Salem et al. (2010) relataram este mesmo evento na Rússia.

A submissão dos dezoito *primers* (P1, P2, P3, P4, M1, M2, M3, M4, S1, S2, S3, S4, 2Bp, 4Bm, CV2U, CV2L, F1121 e R1122 descritos no Quadro 2) ao BLAST/n permitiu inferir a ausência de hibridizações com sequências não homólogas àquelas esperadas, fator que favorece a especificidade da técnica de PCR. A inspeção de dímeros e/ou *hairpins* em relação aos oligonucleotídeos iniciadores demonstrou previamente que a dinâmica das reações não seria afetada por interações entre os *primers*, as quais poderiam resultar no impedimento do anelamento destes nas regiões de interesse e/ ou em uma competição pela amplificação de dímeros de *primer* e as sequências alvo, diminuindo a sensibilidade das reações.

O conhecimento do envolvimento do ácido siálico (Figura 2) na infectividade do vírus (HASELHORST et al., 2009; TIHOVA et al., 2011) permite o estudo sobre a existência de variados graus de patogenicidade nos diferentes genotipos rotavirais.

Os genotipos correspondentes aos sorotipos contemplados pelas vacinas contra rotavirose suínas disponíveis comercialmente (item 2.1.12) são apenas o G4 e G5. Neste sentido, somente um genótipo, encontrado no presente estudo (G5), é contemplado nas formulações vacinais, o que traz desvantagens em termos de proteção dos animais. O

conhecimento da circulação dos rotavírus em granjas de suínos permite estudos quanto à transmissão zoonótica e interespecies do agente, além de possibilitar o desenvolvimento, não só de imunógenos que contemplem linhagens homólogas e poucos sorotipos/ genotipos suínos, mas também de vacinas heterólogas e que abranjam uma maior amplitude de sorotipos/ genotipos do vírus, que acometem a espécie suína.

7 CONCLUSÕES

Os dados obtidos demonstraram que há uma elevada frequência de ocorrência de rotavírus nas criações comerciais, acometendo 40,37% do total de amostras testadas (88/218) e 91,6% dos municípios amostrados (11/12 municípios). Se considerarmos as granjas de suínos localizadas em 12 diferentes municípios, observou-se que apenas uma não apresentou casos de rotavírus, o que demonstrou a importância do fortalecimento do controle e de medidas profiláticas direcionadas ao agente.

Não foi observada a circulação de coronavírus suínos nas criações, demonstrando que a técnica de *nested* RT-PCR empregada para as 218 amostras provenientes de 12 diferentes municípios (Embu-Guaçu, Boituva, Iracemópolis, Limeira, Bragança Paulista, Nova Odessa, Itú, Ibiúna, Pedra Bela, Leme, Itapeva e Piedade) do Estado de São Paulo, analisados neste estudo, este agente viral não foi encontrado na espécie suína.

Quanto aos genótipos de rotavírus, ficou evidente a necessidade de revisão e/ou desenho de novos primers de PCR específicos para a espécie suína, de modo a contemplar a diversidade viral circulante deste vírus.

A caracterização dos rotavírus em genótipos foi feita mediante sequenciamento de fragmentos parciais dos genes codificadores da VP7 e VP4, onde se detectou G3, G5 e G9 em combinação com P[6], P[13] (e/ou P[22]) e P[23]. A combinação G5P[23] não havia sido relatada até o presente.

A comparação da patogenicidade e virulência causadas por substituições de aminoácidos é necessária para uma compreensão mais ampla das infecções causadas por rotavírus bem como para a predição da eficiência de imunógenos.

REFERÊNCIAS

Relatório ABIPECS 2010. **ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA PRODUTORA E EXPORTADORA DE SUÍNOS (ABIPECS)**. Disponível em: <http://www.abipecs.org.br/uploads/relatorios/relatorios-associados/ABIPECS_relatorio_2010_pt.pdf>. Acesso em: 15 dez. 2012a.

Crise de custos no 1º semestre, recuperação de preços na segunda metade e exportações ao redor de 580 mil toneladas. **ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA PRODUTORA E EXPORTADORA DE SUÍNOS (ABIPECS)**. Disponível em: <<http://www.abipecs.org.br/news/622/134/2012-Crise-de-custos-no-1-semester-recuperacao-de-precos-na-segunda-metade-e-exportacoes-ao-redor-de-580-mil-toneladas.html>>. Acesso em: 15 dez. 2012b.

ANDRIES, K.; PENSAERT, M. B. Virus isolated and immunofluorescence in different organs of pigs infected with hemagglutinating encephalomyelitis virus. **American Journal of Veterinary Research**, v. 41, p. 215-218, 1980.

AHMED, K.; ANH, D. D.; NAKAGOMI, O. Rotavirus G[5]P[6] in child with diarrhea. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, p. 1235-1235, 2007.

ALFIERI, A.; ALFIERI, A. F.; FREITAS, J. C.; SILVA, C. A.; FREIRE, R. L.; ARROS, A. R.; BARREIROS, M. A. B.; MULLER, E. E. Ocorrência de *E. coli*, Rotavírus, Picobirnavírus e *Cryptosporidium* em um foco de diarreia do pós-desmame em suínos. **SEMINA (Ciências Agrárias)**, v. 15, n. 3, p. 5-7, 1994.

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

ANGEL, J.; FRANCO, M. A.; GREENBERG, H. B. Rotavirus immune responses and correlates of protection. **Current Opinion in Virology**, v. 2, p. 419-425, 2012.

ARNOLD, M. M.; PATTON, J. T. Diversity of interferon antagonist activities mediated by NSP1 proteins of different rotavirus strains. **Journal of Virology**, v. 85, p. 1970-1979, 2011.

ATHANASSIOUS, R.; MARSOLAIS, G.; ASSAF, R.; DEA, S.; DESCÔTEAUX, J. P.; DULUDE, S.; MONTPETIT, C. Detection of bovine coronavirus and type A rotavirus in neonatal calf diarrhea and Winter dysentery of cattle in Quebec: evaluation of three diagnostic methods. **Canadian Veterinary Journal**, v. 35, p. 163-169, 1994.

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

BÁNYAI, K.; MARTELLA, V.; JAKAB, F.; MELEGH, B.; SZÜCS, G. Sequencing and phylogenetic analyses of human genotype P[6] rotavirus strains detected in Hungary provides evidence for genetic heterogeneity within the P[6] VP4 gene. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 4338-4443, 2004.

BÁNYAI, K.; FORGÁCH, P.; ERDÉLYI, K.; MARTELLA, V.; BOGDÁN, A.; HOCSÁK, E.; HAVASI, V.; MELEGH, B.; SZÜCS, G. Identification of the novel lapine rotavirus genotype P[22] from an outbreak of enteritis in a Hungarian rabbitry. **Journal of Virus Research**, v. 113, n. 2, p. 73-80, 2005.

BARREIROS, M. A.; ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A. F.; MÉDICI, 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 Communications**, v. 27, n. 6, p. 505-12, 2003.

BATISTA, E. R.; VALLE, M. B.; MARTELL, A. B. Gastroenteritis Transmisível do Cerdão: um reto de la indústria Porcina. **Revista Eletrônica de Veterinária REDVET**, v. 6, n. 7, p. 1-11, 2005.

BEAUDETTE, F. R.; HUDSON, C. B. Cultivation of the virus of infectious bronchitis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 90, p. 51-60, 1937.

BEARDS, G. M.; CAMPBELL, A. D.; COTTRELL, N. R.; PEIRIS, J. S.; REES, N.; SANDERS, R. C.; SHIRLEY, J. A.; WOOD, H. C.; FLEWETT, T. H. Enzyme-linked immunosorbent assays based on polyclonal and monoclonal antibodies for rotavirus detection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 19, n. 2, p. 248-254, 1984.

BEARDS, G. M.; DESSELBERGER, U.; FLEWETT, T. H. Temporal and geographical distributions of human rotavirus serotypes, 1983 to 1988. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, p. 2827-2833, 1989.

BELOUZARD, S.; MILLET, J. K.; LICITRA, B. N.; WHITTAKER, G. R. Mechanisms of coronavirus cell entry mediated by the viral spike protein. **Viruses**, v. 4, p. 1011-1033, 2012.

BERGMANN, C. C.; LANE, T. E.; STOHLMAN, S. A. Coronavirus infection of the central nervous system: host-virus stand-off. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, p. 121-132, 2006.

BERN, C.; GLASS, R. I. Impact of diarrheal diseases worldwide. In: KAPIKIAN, A. Z. (Ed.). **Viral Infections of the Gastrointestinal Tract**. 2. ed. Nova Iorque: Marcel Dekker Inc., 1994. p. 1-26.

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

BRANDÃO, P. E.; GREGORI, F.; VILLARREAL, L. Y. B.; ROSALES, C. A. R.; SOARES, R. M.; JEREZ, J. A. A nested polymerase chain reaction to Bovine Coronavirus diagnosis based on the RNA-dependent RNA-polymerase gene. **Virus Reviews & Research**, v. 10, n. 1, p. 45-49, 2005.

BRANDT, C. D.; ARNDT, C. W.; EVANS, G. L.; KIM, H. W.; STALLINGS, E. P.; RODRIGUEZ, W. J.; PARROTT, R. H. Evaluation of a latex test for rotavirus detection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 25, n. 9, p. 1800-1802, 1987.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Programa Nacional de Sanidade Suídea**. Instrução Normativa nº 47, de 18 de junho de 2004. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/>>. Acesso em: 15 de dez. 2012.

BRIDGER, J. C.; WOODE, G. N. Neonatal calf diarrhea: identification of a reovirus-like (rotavirus) agent in faeces by immunofluorescence and immune electron microscopy. **British Veterinary Journal**, v. 31, p. 528-535, 1975.

BRENTANO, L.; CIACCI-ZANELLA, J. R.; MORES, N.; PIFFER, I. A. Levantamento soropidemiológico para coronavírus respiratório e da gastroenterite transmissível e dos vírus de influenza H3N2 E H1N1 em rebanhos suínos no Brasil. **Comunicado Técnico Embrapa**, n. 306, p. 1-6, 2002.

BRUNET, J. P.; COTTE-LAFFITTE, J.; LINXE, C.; QUERO, A. M.; GÉNITEAU-LEGENDRE, M.; SERVIN, A. Rotavirus infection induces an increase in intracellular calcium concentration in human intestinal epithelial cells: role microvillar actin alteration. **Journal of Virology**, v. 74, p. 2323–2332, 2000.

BOK, K.; CASTAGNARO, N.; BORSA, A.; NATES, S.; ESPUL, C.; FAY, O.; FABRI, A.; GRINSTEIN, S.; MICELI, I.; MATSON, D. O.; GÓMEZ, J. A. Surveillance for rotavirus in Argentina. **Journal of Medical Virology**, v. 65, n. 1, p. 190-198, 2001.

BUESA, J.; COLOMINA, J.; RAGA, J.; VILLANUEVA, A.; PRAT, J. Evaluation of reverse transcription and polymerase chain reaction (RT/PCR) for the detection of rotaviruses: applications of the assay. **Research in Virology**, v. 146, n. 6, p. 353-361, 1996.

CAMERON, M. J.; RAN, L.; XU, L.; DANESH, A.; BERMEJO-MARTIN, J. F.; CAMERON, C. M.; MULLER, M. P.; GOLD, W. L.; RICHARDSON, S. E.; POUTANEN, S. M.; WILLEY, B. M.; DEVRIES, M. E.; FANG Y.; SENEVIRATNE, C.; BOSINGER, S. E.; PERSAD, D.; WILKINSON, P.; GRELLER, L. D.; SOMOGYI, R.; HUMAR, A.; KESHAVJEE, S.; LOUIE M.; LOEB, M. B.; BRUNTON, J.; MCGEER, A. J.; KELVIN, D. J. Interferon-mediated immunopathological events are associated with atypical innate and adaptive immune responses in patients with severe acute respiratory syndrome. **Journal of Virology**, v. 81, p. 8692–8706, 2007.

CANDEIAS, J. A. N.; ROSENBERG, C. P.; RÁCZ, M. L. Identificação por contraímunoelctroforese de rotavírus em casos de diarreia infantil. **Revista de Saúde Pública**, v. 12, p. 99-103, 1978.

CAPPELLARO, C. E. M. P. D. M.; BERSANO, J. G.; CATROXO, M. H. B.; MUELLER, S. B. K. Presença de coronavírus associado a surto de gastroenterite em suínos no município de Mairinque, SP, no ano de 1988. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 65, n. 2, p. 111-116, 1998.

CARTER, J. B.; SAUNDERS, V. A. Reoviruses (and other sdRNA viruses): Rotavirus virion. In: WILEY, J.; SONS. **Virology principles and applications**. England: John Wiley & Sons, Ltd., 2007. p.148-155.

CASTILLO, J. R.; LUDERT, J. E.; SANCHEZ, A.; RUIZ, M. C.; MICHELANGELI, F.; LIPRANDI, F. Rotavirus infection alter Na^+ and K^+ homeostasis in MA104 cells. **Journal of General Virology**, v. 72, p. 541-547, 1991.

CAVANAGH, D. The coronavirus surface protein, p.73-113. In: SIDDELL, S. G. **The coronaviridae**. New York: Plenum, 1995.

CHAN-IT, W.; KHAMRIN, P.; SAEKHOW, P.; PANTIP, C.; THONGPRACHUM, A.; PEERAKOME, S.; USHIJIMA, H.; MANEEKARN, N. Multiple combinations of P[13]-like genotype with G3, G4, and G5 in porcine rotaviruses. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 4, p. 1169-1173, 2008.

CHEEVER, F. S.; DANIELS, J. B.; PAPPENHEIMER, A. M.; BAILEY, O. T. A Murine virus (JHM) causing disseminated encephalomyelitis with extensive destruction of myelin. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 90, n. 3, p. 181-194, 1949.

CHEN, W.; YAN, M.; YANG, L.; DING, B.; HE, B.; WANG, Y.; LIU, X.; LIU, C.; ZHU, H.; YOU, B.; HUANG, S.; ZHANG, J.; MU, F.; XIANG, Z.; FENG, X.; WEN, J.; FANG, J.; YU, J.; YANG, H.; WANG, J. SARS-associated coronavirus transmitted from human to pig. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 3, p. 446-448, 2005.

CHEN, Y.; CAI, H.; PAN, J.; XIANG, N.; TIEN, P.; AHOLA, T.; GUOA, D. Functional screen reveals SARS coronavirus nonstructural protein nsp14 as a novel cap N7 methyltransferase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 9, p. 1-6, 2009.

CHEN, J.; WANG, C.; SHI, H.; QIU, H. J.; LIU, S.; SHI, D.; ZHANG, X.; FENG, L. Complete genome sequence of a chinese virulent porcine epidemic diarrhea virus strain. **Journal of Virology**, v. 85, n. 21, p. 11538-11539, 2011.

CHUNG, K. T.; MCCRAE, M. A. Regulation of gene expression by the NSP1 and NSP3 non-structural proteins of rotavirus. **Archives of Virology**, v. 156, p. 2197-2203, 2011.

CIARLET, M.; ESTES, M. K. Rotaviruses: basic biology, epidemiology and methodologies. In: BITTON, G. (Ed.). **Encyclopedia of environmental microbiology**. New York: Wiley, 2002. p. 2753-2773.

CIARLET, M.; HOFFMANN, C.; LORUSSO, E.; BASELGA, R.; CAFIERO, M.A.; BÁNYAI, K.; MATTHIJNSSENS, J.; PARREÑO, V.; DE GRAZIA, S.; BUONAVOGLIA, C.; MARTELLA, V. Genomic characterization of a novel group A lamb rotavirus strain isolated in zaragoza, Spain. **Virus Genes**, v. 37, p. 250-265, 2008.

COLLINS, P. J.; MARTELLA, V.; SLEATOR, R. D.; FANNING, S.; O'SHEA, H. Detection and characterization of group A rotavirus in asymptomatic piglets in southern Ireland. **Archives of Virology**, v. 155, p. 1247-1259, 2010.

COMPTON, S. R.; ROGERS, D. B.; HOLMES, K. V.; FERTSCH, D.; REMENICK, J.; MCGOWAN J. J. In vitro replication of mouse hepatitis virus strain A59. **Journal of Virology**, v. 61, n. 6, p. 1814-1820, 1987.

COMPTON, S. R.; BARTHOLD, S. W.; SMITH, A. L. The cellular and molecular pathogenesis of coronaviruses. **Laboratory Animal Science**, v. 43, n. 1, p. 15-28, 1993.

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.

CUCKOR, G.; BERRY, M. K.; BLACKLOW, N. R. Simplified radioimmunoassay for detection of human rotavirus in stools. **Journal of Infectious Disease**, v. 138, p. 906-910, 1978.

DECROLY, E.; IMBERT, I.; COUTARD, B.; BOUVET, M.; SELISKO, B.; ALVAREZ, K.; GORBALENYA, A. E.; SNIJDER, E. J.; CANARD, B. Coronavirus nonstructural protein 16 is a cap-0 binding enzyme possessing (nucleoside-2'O)-methyltransferase activity. **Journal of Virology**, v. 82, p. 8071-8084, 2008.

DEO, R. C.; GROFT, C. M.; RAJASHANKAR, K. R.; BURLEY, S. K. Recognition of the rotavirus mRNA 3' consensus by an asymmetric NSP3 homodimer. **Cell**, v. 108, p. 71-81, 2002.

DENNEHY, P. H. Rotavirus vaccines: An overview. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21, n. 1, p. 198-208, 2008.

DENISON, M. R.; GRAHAM, R. L.; DONALDSON, E. F.; ECKERLE, L. D.; BARIC, R. S. An RNA proofreading machine regulates replication fidelity and diversity. **RNA Biology**, v. 8, n. 2, p. 270-279, 2011.

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

DORMITZER, P. R.; GREENBERG, H. B. Calcium chelation induces a conformational change in recombinant herpes simplex virus-1-expressed rotavirus VP7. **Virology**, v. 189, n. 2, p. 828-832, 1992.

DOYLE, L. P.; HUTCHINGS, L. M. A transmissible gastroenteritis in pigs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 108, p. 257-259, 1946.

DHARAKUL, T.; ROTT, L.; GREENBERG, H. B. Recovery from chronic rotavirus infection in mice with severe combined immunodeficiency: virus clearance mediated by adoptive transfer of immune CD8⁺ T lymphocytes. **Journal of Virology**, v. 64, n. 9, p. 4375-4382, 1990.

ECKERLE, L. D.; LU, X.; SPERRY, S. M.; CHOI, L.; DENISON, M. R. High fidelity of murine hepatitis virus replication is decreased in nsp14 exoribonuclease mutants. **Journal of Virology**, v. 81, p. 12135–12144, 2007.

EGLOFF, M.; FERRON, F.; CAMPANACCI, V.; LONGHI, S.; RANCUREL, C.; DUTARTRE, H.; SNIJDER, E. J.; GORBALENYA, A. E.; CAMBILLAU, C.; CANARD, B. The severe acute respiratory syndrome-coronavirus replicative protein nsp9 is a single-stranded RNA-binding subunit unique in the RNA virus world. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 11, p. 3792-3796, 2004.

ELNIFRO, E. M.; ASHSHI, A. M.; COOPER, R. J.; KLAPPER, P. E. Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, n. 4, p. 559-570, 2000.

ESCU TENAIRE, S.; MOHAMED, N.; ISAKSSON, M.; THORÉN, P.; KLINGEBORN, B.; BELÁK, S.; BERG, M.; BLOMBERG, J. SYBR green real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay for the generic detection of coronaviruses. **Archives of Virology**, v. 152, n. 1, p. 41-58, 2007.

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

ESTES, M. K. Rotaviruses and their replication. In: KNIPE D. M.; HOWLEY, P. M.; GRIFFIN, D. E. (Ed.). **Fields virology**. 4. ed. Philadelphia: Lippincott, Williams and Wilkins, 2001.

ESTES, M. K.; KAPIKIAN, A. Z. Rotaviruses. In: KNIPE D. M.; HOWLEY, P. M. (Ed.). **Fields virology**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott, Williams and Wilkins, 2007. p. 1917–1974.

ESTES, M. K.; DESSELBERGER, U. Rotaviruses: cause of vaccine-preventable disease yet many fundamental questions remain to be explored. **Current Opinion in Virology**, v. 2, p. 369-372, 2012.

FENG, N.; SEN, A.; NGUYEN, H.; VO, P.; HOSHINO, Y.; DEAL, E. M.; GREENBERG, H.B. Variation in antagonism of the interferon response to rotavirus NSP1 results in differential infectivity in mouse embryonic fibroblasts. **Journal of Virology**, v. 83, p. 6987-6994, 2009.

FLEWETT, T. H.; BRYDEN, A. S.; DAVIES, H.; WOODE, G. N.; BRIDGER, J. C.; DERRICK, J. M. Relation between viruses from acute gastroenteritis of children and newborn calves. **Lancet**, v. 2, p. 61–63, 1974.

FLEWETT, T. H. Electron microscopy in the diagnosis of infectious diarrhea. **Journal of Medical Association**, v. 173, p. 538-541, 1978.

FLORES, J.; SEARS, J.; GREEN, K. Y.; PEREZ-SCHAEEL, 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.

FRIEMAN, M.; YOUNT, B.; HEISE, M.; KOPECKY-BROMBERG, S. A.; PALESE, P.; BARIC, R. S. Severe acute respiratory syndrome coronavirus ORF6 antagonizes STAT1 function by sequestering nuclear import factors on the rough endoplasmic reticulum/Golgi membrane. **Journal of Virology**, v. 81, p. 9812–9824, 2007.

GATTI, S. M. V.; HARA, N. H.; FERRAZ, M. M. G.; PESTANA DE CASTRO, A. F. Presence of group A and non-A rotaviruses in neonatal piglets in Campinas, SP, Brazil. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 178, p. 347-349, 1989.

GÉLINAS, A. M.; BOUTIN, M.; SASSEVILLE, A. M.; DEA, S. Bovine coronaviruses associated with enteric and respiratory diseases in Canadian dairy cattle display different reactivities to anti-HE monoclonal antibodies and distinct amino acid changes in their HE, S and ns4.9 protein. **Virus Research**, v. 76, p. 43-57, 2001.

GORZIGLIA, M.; LARREA, C.; LIPRANDI, F.; ESPARZA, J. Biochemical evidence for the oligomeric (possibly trimeric) structure of the major inner capsid polypeptide (45K) of rotaviruses. **Journal of General Virology**, v. 66, n. 9, p. 1889-1900, 1985.

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

GOUVEA, V.; SANTOS, N.; TIMENETSKY, M. C. Identification of bovine and porcine rotavirus G types by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 5, p. 1338-1340, 1994a.

GOUVEA, V.; SANTOS, N.; TIMENETSKY, M. C. VP4 typing of bovine and porcine group A rotaviruses by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 5, p. 1333-1337, 1994b.

GHOSH, S.; VARGHESE, V.; SAMAJDAR, 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.

GRAHAM, D. Y.; ESTES, M. K. Proposed working serologic classification system for rotaviruses. **Annales de l'Institut Pasteur de Virologie**, v. 136, p. 5-12, 1985.

GREEN, K. Y.; SEARS, J. F.; TANIGUCHI, K.; MIDTHUN, K.; HOSHINO, Y.; GORZIGLIA, M.; NISHIKAWA, K.; URASAWA, S.; KAPIKIAN, A. Z.; CHANOCK, R. M. Prediction of human rotavirus serotype by nucleotide sequence analysis of the VP7 protein gene. **Journal of Virology**, v. 62, n. 5, p. 1819-1823, 1988.

GREEN, K. Y.; TANIGUCHI, K.; MACKOW, E. R.; KAPIKIAN, A. Z. Homotypic and heterotypic epitope-specific antibody responses in adult and infant rotavirus vaccinees: implications for vaccine development. **Journal of Infectious Diseases**, v. 161, n. 4, p. 667-679, 1990.

GREENBERG, H. B.; FLORES J.; KALICA, A. R.; WYATT, R. G.; JONES, R. Gene coding assignments for growth restriction, neutralization and subgroup specificities of the Wa and DS-1 strains of human rotavirus. **Journal of General Virology**, v. 64, p. 313-320, 1983.

GREGORI, F.; BRANDÃO, P. E.; ROSALES, C. A. R.; CORTEZ, A.; HEINEMANN, M. B.; RICHTZENHAIN, L.; JEREZ, J. A. Desenvolvimento de um método de ELISA para a detecção de rotavírus a partir de material fecal. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 67, n. 2, p. 191-194, 2000.

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, n. 9, p. 707-712, 2009.

GROFT, C. M.; BURLEY, S. K. Recognition of eIF4G by rotavirus NSP3 reveals a basis for mRNA circularization. **Molecular Cell**, v. 9, p. 1273-1283, 2002.

GUEDES, R. **Imunoistoquímica: entendendo e utilizando a técnica no diagnóstico de enfermidades suínas**. Pork World. Campinas: Editora Animal World, 2011. Disponível em: <<http://www.porkworld.com.br/artigos/post/imuno-histoquimica-entendendo-e-utilizando-a-tecnica-no-diagnostico-de-enfermidades-suinas>>. Acesso em: 15 jan. 2013.

GUTIÉRREZ-AGUIRRE, I.; STEYER, A.; BOBEN, J.; GRUDEN, K.; POLJSK-PRIJATELJ, M.; RAVNIKAR, M. Sensitive detection of multiple rotavirus genotypes with a single reverse transcription-real-time quantitative PCR assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 8, p. 2547-2554, 2008.

HALAIHEL, N.; LIÉVIN, V.; ALVARADO, F.; VASSEUR, M. Rotavirus infection impairs intestinal brush-border membrane Na⁺-solute cotransport activities in young rabbits. **American Journal Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 279, p. 587-596, 2000a.

HALAIHEL, N.; LIÉVIN, V.; BALL, J. M.; ESTES, M. K.; ALVARADO, F.; VASSEUR, M. Direct inhibitory effect of rotavirus NSP4(114–135) peptide on the Na⁺-D-glucose symporter of rabbit intestinal brush border membrane. **Journal Virology**, v. 74, p. 9464-9470, 2000b.

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

HASELHORST, T.; FLEMING, F. E.; DYASON, J. C.; HARTNELL, R. D.; YU, X.; HOLLOWAY, G.; SANTEGOETS, K.; KIEFEL, M. J.; BLANCHARD, H.; COULSON, B. S.; ITZSTEIM, M. V. Sialic acid dependence in rotavirus host cell invasion. **Nature Chemical Biology**, v. 5, n. 2, p. 91-93, 2009.

HEATON, P. M.; CIARLET, M. The pentavalent rotavirus vaccine: discovery to licensure and beyond. **Clinical Infectious Diseases**, v. 45, p. 1618–1624, 2007.

HERRING, A. J.; INGLIS, N. F.; OJEH, C. K.; SNODGRASS, D. R.; MENZIES, J. D. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 16, n. 3, p. 473-477, 1982.

HEWISH, M. J.; TAKADA, Y.; COULSON, B. S. Integrins alpha2beta1 and alpha4beta1 can mediate SA11 rotavirus attachment and entry into cells. **Journal of Virology**, v. 74, n. 1, p. 228-36, 2000.

HIRANO, N.; NOMURA, R.; TAWARA, T.; TOHYAMA, K. Neurotropism of swine Haemagglutinating encephalomyelitis virus (Coronavirus) in mice depending upon host age and route of infection. **Journal of Comparative Pathology**, v. 130, p. 58-65, 2004.

HJELT, K.; GRAUBALLE, P. C.; PAERREGAARD, A.; NIELSEN, O. H.; KRASILNIKOFF, P. A. Protective effect of preexisting rotavirus-specific immunoglobulin A against naturally acquired rotavirus infection in children. **Journal of Medical Virology**, v. 21, n. 1, p. 39-47, 1987.

HOLMES, K. V.; LAI, M. M. C. Coronaviridae: the viruses and their replication. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Ed.). **Virology**. 3. ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1996. p. 1075-1093.

HOMAIKAN, F. R.; TORRES, A.; DONOWITZ, M.; SHARP, G. W. Electrolyte transport in piglets infected with transmissible gastroenteritis virus. Stimulation by verapamil and clonidine. **Gastroenterology**, v. 101, p. 895-901, 1991.

HU, L.; CRAWFORD, S. E.; HYSER, J. M.; ESTES, M. K.; PRASAD, B. V. V. Rotavirus non-structural proteins: structure and function. **Current Opinion in Virology**, v. 2, p. 380-388, 2012.

HUI, R. K. H.; ZENG, F.; CHAN, C. M. N.; YUEN, K. Y.; PEIRIS, J. S. M.; LEUNG, F. C. C. Reverse transcriptase PCR diagnostic assay for the Coronavirus associated with Severe Acute Respiratory Syndrome. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 5, p. 1994-1999, 2004.

HUSSAIN, M.; SETH, P.; BROOR, S. Detection of group A rotavirus by reverse transcription polymerase reaction in feces from children with acutr gastroenteritis. **Archieves of Virology**, v. 140, p. 1225-1233, 1995.

HWANG, K.; WU, F.; BÁNYAI, K.; WU, H.; YANG, D. C.; HUANG, Y.; LIN, J.; HSIUNG, C. A.; HUANG, J. C.; JIANG, B.; GENTSCH, J. R. Identification of porcine rotavirus-like genotype P[6] strain in Taiwanese children. **Journal of Medical Microbiology**, v. 61, p. 990-997, 2012.

IMBERT, I.; GUILLEMOT, J.; BOURHIS, J.; BUSSETTA, C.; COUTARD, B.; EGLOFF, M.; FERRON, F.; GORBALENYA, A. E.; CANARD, B. A second, non-canonical RNAdependent RNA polymerase in SARS coronavirus. **EMBO Journal**, v. 25, p. 4933-4942, 2006.

ITURRIZA-GÓMARA, M.; GREEN, J.; BROWN, D. W.; DESSELBERGER, U.; GRAY, J. J. Comparison of specific and random priming in the reverse transcriptase polymerase chain reaction for genotyping group A rotaviruses. **Journal of Virology Methods**, v. 78, n. 1-2, p. 93-103, 1999.

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

JEREZ, J. A. Diarreias virais dos bezerros: rotavírus e coronavírus. **Biológico**, v. 59, n. 2, p. 33-37, 1997.

JUNG, K.; KIM, J.; KIM, O.; KIM, B.; CHAE, C. Differentiation between porcine epidemic diarrhea virus and transmissible gastroenteritis virus in formalin-fixed paraffin-embedded tissues by multiplex RT-nested PCR and comparison with in situ hybridization. **Journal of Virological Methods**, v. 108, p. 41-47, 2003.

JUNG, K.; KANG, B.; LEE, C.; SONG, D. Impact of porcine group A rotavirus co-infection on porcine epidemic diarrhea virus pathogenicity in piglets. **Research in Veterinary Science**, v. 84, p. 502-506, 2007.

JUNWEI, G.; BAOXIAN, L.; LIJIE, T.; YIJING, L. Cloning and sequence analysis of the N gene of porcine epidemic diarrhea virus LJB/03. **Virus Genes**, v. 33, p. 215-219, 2006.

KING, A. M. Q.; ADAMS, M. J.; CARSTENS, E. B.; LEFKOWITZ, E. J. (Ed.). **Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses**. 9. ed. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2012. 1272 p.

KREMPL, C.; SCHULTZE, B.; LAUDE, H.; HERRLER, G. Point mutation in the S protein connect the sialic acid binding activity with the enteropathogenicity of transmissible gastroenteritis coronavirus. **Journal of Virology**, v. 71, p. 3285-3287, 1997.

KREMPL, C.; BALLESTEROS, M. L.; ZIMMER, G.; ENJUANES, L.; KLENK, H. D.; HERRLER, G. Characterization of sialic acid binding activity of transmissible gastroenteritis coronavirus by analysis of haemagglutination-deficient mutants. **Journal of General Virology**, v. 81, p. 489-496, 2000.

KUMAR, M.; JAYARAM, H.; CARPIO, R. V.; JIANG, X.; TARAPOREWALA, Z. F.; JACOBSON, R. H.; PATTON, J. T.; PRASAD, B. V. Crystallographic and biochemical analysis of rotavirus NSP2 with nucleosides reveals an NDP kinase like activity. **Journal of Virology**, v. 81, p. 12272-12284, 2007.

KUO L.; MASTERS P. S. Genetic evidence for a structural interaction between the carboxy termini of the membrane and nucleocapsid proteins of mouse hepatitis virus. **Journal of Virology**, v. 76, n. 10, p. 4987-4999, 2002.

LAI, M. M.; CAVANAGH, D. The molecular biology of coronaviruses. **Advances in Virus Research**, v. 48, p. 1-100, 1997.

LAI, M. M. C.; PERLMAN, S.; ANDERSON, L. J. Coronaviridae. In: KNIPE D. M.; HOWLEY, P. M. (Ed.). **Fields virology**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott, Williams and Wilkins, 2007. p. 1306-1335.

LARKIN, M. A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N. P.; CHENNA, R.; MCGETTIGAN, P. A.; MCWILLIAM, H.; VALENTIN, F.; WALLACE, I. M.; WILM, A.; LOPEZ, R.; THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; HIGGINS, D. G. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, v. 23, p. 2947-2948, 2007.

LARRALDE, G.; LI, B. G.; KAPIKIAN, A. Z.; GORZIGLIA, M. Serotype-specific epitope(s) present on the VP8 subunit of rotavirus VP4 protein. **Journal of Virology**, v. 65, n. 6, p. 3213-3218, 1991.

LAUDE, H.; VAN REETH, K.; PENSAERT M. Porcine respiratory coronavirus: molecular features and virus host interactions. **Veterinary Research**, v. 24, p. 125-150, 1993.

LI, W.; SHI, Z.; YU, M.; REN, W.; SMITH, C.; EPSTEIN, J. H.; WANG, H.; CRAMERI, G.; HU, Z.; ZHANG, H.; ZHANG, J.; MCEACHERN, J.; FIELD, H. DASZAK, P.; EATON, B. T.; ZHANG, S.; WANG, L. Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses. **Science**, v. 310, n. 5748, p. 676-679, 2005.

LINARES, R. C.; BARRY, A. F.; ALFIERI, A. F.; KERLEI, C. M. 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.

LORUSSO, A.; DECARO, N.; SCHELLEN, P.; ROTTIER, P. J. M.; BUONAVOGLIA, C.; HAIJEMA, B.; GROOT, R. J. Gain, preservation, and loss of a group 1a coronavirus accessory glycoprotein. **Journal of Virology**, v. 82, p. 10312-10317, 2008.

MAASS, D. R.; ATKINSON, P. H. Rotavirus proteins VP7, NS28, and VP4 form oligomeric structures. **Journal of Virology**, v. 64, n. 6, p. 2632-2641, 1990.

MACKOW, E. R.; SHAW, R. D.; MATSUI, S. M.; VO, P. T.; BENFIELD, D. A.; GREENBERG, H. B. Characterization of homotypic and heterotypic VP7 neutralization sites of rhesus rotavirus. **Virology**, v. 165, n. 2, p. 511-517, 1988.

MADHI, S. A.; CUNLIFFE, N. A.; STEELE, D.; WITTE, D.; KIRSTEN, M.; LOUW, C.; NGWIRA, B.; VICTOR, J. C.; GILLARD, P. H.; CHEUVART, B. B.; HAN, H. H.; NEUZIL, K. M. Effect of human rotavirus vaccine on severe diarrhea in African infants. **The New England Journal of Medicine**, v. 362, p. 289-298, 2010.

MAEDA J.; MAEDA A.; MAKINO S. Release of coronavirus E protein in membrane vesicles from virus-infected cells and E protein-expressing cells. **Virology**, v. 263, n. 2, p. 265-272, 1999.

MARTELLA, V.; BÁNYAI, K.; CIARLET, M.; ITURRIZA-GÓMARA, M.; LORUSSO, E.; DE GRAZIA, S.; ARISTA, S.; DECARO, N.; ELIA, G.; CAVALLI, A.; CORRENTE, M.; LAVAZZA, A.; BASELGA, R.; BUONAVOGLIA, C. Relationships among porcine and human P[6] rotaviruses: evidence that the different human P[6] lineages have originated from multiple interespecies transmission events. **Virology**, v. 344, p. 509-519, 2006.

MARTELLA, V.; CIARLET, M.; BANYAI, K.; LORUSSO, E.; ARISTA, S.; LAVAZZA, A.; PEZZOTI, G.; DECARO, N.; CAVALLI, A.; LUCENTE, M. S.; CORRENTE, M.; ELIA, G.; CAMERO, M.; TEMPESTA, M.; BUONAVOGLIA, C. Identification of group A porcine rotavirus strains bearing a novel VP4 (P) genotype in Italian Swine Herds. **Journal of Clinical Microbiology**, v.45, n. 2, p. 577-580, 2007.

MARTELLA, V.; COLOMBRITA, D.; LORUSSO, E.; DRAGHIN, E.; FIORENTINI, S.; GRAZIA, S. D.; BÁNTAI, K.; CIARLET, M.; CARUSO, A.; BUONAVOGLIA, C. Detection of a porcine-like rotavirus in a child with enteritis in Italy. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 10, p. 3501-3507, 2008.

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

MASCARENHAS, J. D. P.; LEITE, J. G.; LIMA, J. C.; HEINEMANN, M. B.; OLIVEIRA, D. S.; ARAÚJO, I. T.; SOARES, L. S.; GUSMÃO, R. P.; GABBAY, Y. B.; LINHARES, A. C. Detection of a neonatal human rotavirus strain with VP4 and NSP4 genes of porcine origin. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, p. 524-532, 2007.

MASTERS, P. S. The molecular biology of coronaviruses. **Advances in Virus Research**, v. 66, p. 193-292, 2006.

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

MATTHIJNSSENS, J.; CIARLET, M.; HEIMAN, E.; ARIJIS, I.; DELBEKE, T.; MCDONALD, S. M.; PALOMBO, E. A.; ITURRIZA-GÓMARA, M.; MAES, M.; 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, n. 7, p. 3204-3219, 2008b.

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-GOMARA, M.; JOHNE, R.; KIRKWOOD, C. D.; MARTELLA, V.; MERTENS, P. P. C.; NAKAGOMI, O.; PARREÑO, V.; RAHMAN, M.; RUGGERI, F. M.; SAIF, L. J.; SANTOS, N.; STEYER, A.; TANIGUCHI, K.; PATTON, J. T.; DESSELBERGER, U.; RANST, M. V. Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). **Archives of Virology**, v. 156, n. 8, p. 1397-413, 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.; COHEN, J.; ESTES M. The rotavirus proteins. In: KAPIKIAN, A. Z. (Ed.). **Viral Infectious of gastrointestinal tract**. New York: Marcel Dekker, 1994. p. 169-249.

MCDONALD, S. M.; PATTON, J. T. Assortment and packaging of the segmented rotavirus genome. **Trends in Microbiology**, v. 19, p. 136-44, 2011.

MIYAZAKI, A.; KUGA, K.; SUZUKI, T.; KOHMOTO, M.; KATSUDA, K.; TSUNEMITSU, H. Genetic diversity of group A rotaviruses associated with repeated outbreaks of diarrhea in a farrow-to-finish farm: identification of a porcine rotavirus strain bearing a novel VP7 genotype, G26. **Veterinary Research**, v. 42, n. 112, p. 1-10, 2011.

MOËS, E.; VIJGEN, L.; KEYAERTS, E.; ZLATEVA, K.; LI, S.; MAES, P.; PYRC, K.; BERKHOUT, B.; VAN DER HOEK, L.; VAN RANST, M. A novel pancoronavirus RT-PCR assay: frequent detection of human coronavirus NL63 in children hospitalized with respiratory tract infections in Belgium. **BioMed Central Infectious Diseases**, v. 5, n. 6, p. 1-10, 2005.

MORES, N.; AMARAL, A. L. **Patologias associadas ao desmame**. Concórdia: Embrapa, 2001.

MÖSTL, K. Coronaviridae, pathogenic and clinical aspects: an update. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 13, n. 4, p. 169-180, 1990.

NARAYANAN, K.; HUANG, C.; LOKUGAMAGE, K.; KAMITANI, W.; IKEGAMI, T.; TSENG, C. K.; MAKINO, S. Severe acute respiratory syndrome coronavirus nsp1 suppresses host gene expression, including that of type I interferon, in infected cells. **Journal of Virology**, v. 82, p. 4471-4479, 2008.

NAVAS-MARTIN, S.; WEISS, S. R. SARS: Lessons learned from other Coronaviruses. **Viral Immunology**, v. 16, p. 461-474, 2003.

NISHIDA, M. K.; RUIZ, V. L. A.; GREGORI, F. Detecção de rotavírus em efluentes de criações de suínos no Estado de São Paulo, Brasil. **Ars Veterinaria**, v. 25, n. 3, p. 136-141, 2010.

NISHIKAWA, K.; HOSHINO, Y.; TANIGUCHI, K.; GREEN, K. Y.; GREENBERG, H. B.; KAPIKIAN, A. Z.; CHANOCK, R. M.; GORZIGLIA, M. Rotavirus VP7 neutralization epitopes of serotype 3 strains. **Virology**, v. 171, n. 2, p. 503-515, 1989.

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.

OFFIT, P. A.; CLARK, H. F.; WARD, R. L. Current state of development of human rotavirus vaccines. In: DESSELBERGER, U.; GRAY, J. J. (Ed.). **Viral gastroenteritis**. Amsterdam: Elsevier Science, 2003. p. 345–356.

OGAWA, H.; TAIRA, O.; HIRAI, T.; TAKEUCHI, H.; NAGAO, A.; ISHIKAWA, Y.; TUCHIYA, K.; NONUYA, T.; UEDA, S. Multiplex PCR and multiplex RT-PCR for inclusive detection of major swine DNA and RNA viruses in pigs with multiplex infections. **Journal of Virological Methods**, v. 160, p. 210-214, 2009.

OH, J. S.; SONG, D. S.; YANG, J. S.; SONG, J. Y.; MOON, H. J.; KIM, T. Y.; PARK, B. K. Comparison of an enzyme-linked immunosorbent assay with serum neutralization test for serodiagnosis of porcine epidemic diarrhea virus infection. **Journal of Veterinary Science**, v. 6, n. 4, p. 349-352, 2005.

OKITSU, S.; KHAMRIN, P.; THONGPRACHUM, A.; MANEEKARN, N.; MIZUGUCHI, M.; USHIJIMA, H. Predominance of porcine P[23] genotype rotaviruses in piglets with diarrhea in northern Thailand. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 1, p. 442-445, 2010.

O'NEAL, C. M.; HARRIMAN, G. R.; CONNER, M. E. Protection of the villus epithelial cells of the small intestine from rotavirus infection does not require immunoglobulin A. **Journal of Virology**, v. 74, n. 9, p. 4102-4109, 2000.

OUSINGSAWAT, J.; MIRZA, M.; TIAN, Y.; ROUSSA, E.; SCHREIBER, R.; COOK, D. I.; KUNZELMANN, K. Rotavirus toxin NSP4 induces diarrhea by activation of TMEM 16A and inhibition of Na(+) absorption. **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**, v. 461, p. 579-589, 2011.

PARASHAR, U. D.; HUMMELMAN, E. G.; BRESSE, J. S.; MILLER, M. A.; GLASS, R. I. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 5, p. 562-572, 2003.

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.

PATON, D.; IBATA, G.; SANDS, J.; MCGOLDRICK, A. Detection of transmissible gastroenteritis virus by RT-PCR and differentiation from porcine respiratory coronavirus. **Journal of Virological Methods**, v. 66, p. 303-309, 1997.

PATTON, J. T. Synthesis of simian rotavirus SA11 double-stranded RNA in a cell-free system. **Virus Research**, v. 6, n. 3, p. 217-233, 1986.

PEMBERTON, P. R. Diary of a T.G.E. outbreak in East Yorkshire, February 1999. **The Pig Journal**, v. 44, p. 132-138, 1999.

PENSAERT, M.; CALLEBAUT, P.; COX, E. Enteric coronaviruses of animals. In: KAPIKIAN, A. Z. **Viral Infections of the gastrointestinal tract**. 2. ed. New York: Marcel-Dekker Inc., 1994. p. 627-696.

PENSAERT, M.; CALLEBAUT, P.; VERGOTE, J. Isolate of a porcine respiratory, non-enteric coronavirus related to transmissible gastroenteritis. **Veterinary Quarterly**, v. 8, p. 257-261, 1986.

PEREZ, J. F.; CHEMELLO, M. E.; LIPRANDI, F.; RUIZ, M. C.; MICHELANGELI, F. Oncosis in MA104 cells is induced by rotavirus infection through an increase in intracellular Ca^{2+} concentration. **Virology**, v. 252, p. 17-27, 1998.

PERLMAN, S.; NETLAND, J. Coronaviruses post-SARS: update on replication and pathogenesis. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 6, p. 439-450, 2009.

POPOVA, R.; ZHANG, X. The spike but not the hemagglutinin-esterase protein of bovine coronavirus is necessary and sufficient for viral infection. **Virology**, v. 294, n. 1, p. 222-236, 2002.

RÁCZ, M. L.; KROEFF, S. S.; MUNFORD, V.; CARUZO, T. A. R.; DURIGON, E. L.; HAYASHI, Y.; GOUVEA, V.; PALOMBO, E. Molecular characterization of porcine rotaviruses from the southern region of Brazil: characterization of an atypical genotype G[9] strain. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 6, p. 2443-2446, 2000.

RAINSFORD, E. W.; MCCRAE, M. A. Characterization of the NSP6 protein product of rotavirus gene 11. **Virus Research**, v. 130, p. 193-201, 2007.

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

RATCLIFF, R. M.; CHANG, G.; KOK, T.; SLOOTS, T. P. Molecular diagnosis of medical viruses. **Current Issues in Molecular Biology**, v. 9, p. 87-102, 2007.

RISCO, C.; ANTÓN, I. M.; SUÑÉ, C.; PEDREGOSA, A. M.; MARTÍN-ALONSO, J. M.; PARRA, F.; CARRASCOSA, J. L.; ENJUANES, L. Membrane protein molecules of transmissible gastroenteritis coronavirus also expose the carboxy-terminal region on the external surface of the virion. **Journal of Virology**, v. 69, n. 9, p. 5269-5277, 1995.

RODÁK, L.; SMID, B.; NEVORANKOVÁ, Z.; VALICEK, L.; SMITALOVÁ, R. Use of monoclonal antibodies in blocking ELISA detection of Transmissible Gastroenteritis Virus in faeces of piglets. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 52, p. 105-111, 2005a.

RODÁK, L.; VALICEK, L.; SMID, B.; NEVORANKOVÁ, Z. An ELISA optimized for porcine epidemic diarrhea virus detection in faeces. **Veterinary Microbiology**, v. 105, p. 9-17, 2005b.

ROMERO, C. H.; ROWE, C. A.; BRENTANO, L. E.; FLORES, R. S. Evidência Sorológica da gastroenterite transmissível no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 21, n. 12, p. 129-32, 1985.

SAIF, L. J.; ROSEN, B. I.; PARWANI, A. V. Animal Rotaviruses. In: KAPIKIAN, A. Z. **Viral infections of the gastrointestinal tract**. 2. ed. New York: Marcel-Dekker Inc., 1994. p. 279-367.

SAIF, L. J.; JIANG, B. Nongroup A rotaviruses of humans and animals. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 185, p. 339-371, 1994.

SAIF, L.; YUAN, L.; WARD, L.; TO, T. Comparative studies of the pathogenesis, antibody immune responses, and homologous protection to porcine and human rotaviruses in gnotobiotic piglets. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 412, p. 397-403, 1997.

SAIF, L. J. Animal coronaviruses: what can they teach us about the severe acute respiratory syndrome? **Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties**, v. 23, n. 2, p. 643-660, 2004a.

SAIF, L. J. Animal coronavirus vaccines: lessons for SARS. **Developments in Biologicals**, v. 119, p. 129-140, 2004b.

SAIKATENDU, K. S.; JOSEPH, J. S.; SUBRAMANIAN, V.; CLAYTON, T.; GRIFFITH, M.; MOY, K.; VELASQUEZ, J.; NEUMAN, B. W.; BUCHMEIER, M. J.; STEVENS, R. C.; KUHN, P. Structural basis of severe acute respiratory syndrome coronavirus ADP-ribose-1"-phosphate dephosphorylation by a conserved domain of NSP3. **Structure**, v. 13, n. 11, p. 1665-1675, 2005.

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

SALGADO, J. M.; REIS, R. P.; FIALHO, E. T. Perfil tecnológico e gerencial da Suinocultura do Vale do Piranga (Zona da Mata) de Minas Gerais. **Organizações Rurais & Agroindustriais. Revistas de Administração da UFLA**, v. 5, n. 2, p. 124-135, 2003.

SAN JUAN, C. S.; BELLINZONI, R. C.; MATTION, N.; LA TORRE, J.; SCODELLER, E. A. Incidence of group A and atypical rotaviruses in Brazilian pig herds. **Research in Veterinary Science**, v. 41, n. 2, p. 270-272, 1986.

SÁNCHEZ, C. M.; IZETA, A.; SÁNCHEZ-MORGADO, J. M.; ALONSO, S.; SOLA, I.; BALASH, M.; PLANA-DURÁN, J.; ENJUANES, L. Targeted recombination demonstrates that the Spike gene of transmissible gastroenteritis coronavirus is a determinant of its enteric tropism and virulence. **Journal of Virology**, v. 73, n. 9, p. 7607-7618, 1999.

SANJUÁN, R.; NEBOT, M. R.; CHIRICO, N.; MANSKY, L. M.; BELSHAW, R. Viral mutation rates. **Journal of Virology**, v. 84, p. 9733-9748, 2010.

SÃO PAULO (Estado). Secretaria de Agricultura e Abastecimento. Coordenadoria de Assistência Técnica Integral. Instituto de Economia Agrícola. **Levantamento censitário de unidades de produção agrícola do Estado de São Paulo - LUPA 2007/2008**. São Paulo: SAA/CATI/IEA, 2008. Disponível em: <<http://www.cati.sp.gov.br/projetolupa>>. Acesso em: 10 dez. 2012.

SCHULTZE, B.; KREMPL, C.; BALLESTEROS, M. L.; SHAW, L.; SCHAUER, R.; EJUANES, L.; HERRLER, G. Transmissible gastroenteritis coronavirus, but not the related porcine respiratory coronavirus, has a sialic acid (N-glycolylneuraminic acid) binding activity. **Journal of Virology**, v. 70, p. 5634-5637, 1996.

SCHWEGMANN-WEßELS, C.; HERRLER, G. Sialic acids as receptor determinants for coronavirus. **Glycoconjugate Journal**, v. 23, p. 51-58, 2006.

SEKIGUCHI, Y.; SHIRAI, J.; TANIGUSHI, T.; HONDA, E. Development of reverse transcriptase PCR and nested PCR to detect Porcine Hemagglutinating Encephalomyelitis virus. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v. 66, n. 4, p. 367-372, 2004.

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, p. 11758-67, 2007.

SEYBERT, A.; HEGYI, A.; SIDDELL, S. G.; ZIEBUHR, J. The human coronavirus 229E superfamily 1 helicase has RNA and DNA duplex-unwinding activities with 5-to-3 polarity. **RNA**, v. 6, p. 1056-1068, 2000.

SHI, H.; CHEN, J.; LI, H.; SUN, D.; WANG, C.; FENG, L. Molecular Characterization of a rare G9P[23] porcine rotavirus isolate from China. **Archives of Virology**, v. 157, p. 1897-1903, 2012.

SILVESTRI, L. S.; TORTORICI, M. A.; VASQUEZ-DEL, C. R.; PATTON, J. T. Rotavirus glycoprotein NSP4 is a modulator of viral transcription in the infected cell. **Journal of Virology**, v. 79, p. 15165-15174, 2005.

SNIJDER, E. J.; BREDENBEEK, P. J.; DOBBE, J. C.; THIEL, V.; ZIEBUHR, J.; POON, L. L.; GUAN, Y.; ROZANOV, M.; SPAAN, W. J.; GORBALENYA, A. E. Unique and conserved features of genome and proteome of SARS-coronavirus, an early split-off from the coronavirus group 2 lineage. **Journal of Molecular Biology**, v. 331, p. 991-1004, 2003.

SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D. E. S. N.; MORES, N.; OLIVEIRA, S. J.; CARVALHO, L. F. O. S.; MORENO, A. M.; ROEHE, P. M. **Clínica e patologia suína**. 2. ed. Goiás: Art3, 1998. 464 p.

SONG, H.; TU, C.; ZHANG, G.; WANG, S.; ZHENG, K.; LEI, L.; CHEN, Q.; GAO, Y.; ZHOU, H.; XIANG, H.; ZHENG, H.; CHERN, S. W.; CHENG, F.; PAN, C.; XUAN, H.; CHEN, S.; LUO, H.; ZHOU, D.; LIU, Y.; HE, J.; QIN, P.; LI, L.; REN, Y.; LIANG, W.; YU, Y.; ANDERSON, L.; WANG, M.; XU, R.; WU, X.; ZHENG, H.; CHEN, J.; LIANG, G.; GAO, Y.; LIAO, M.; FANG, L.; JIANG, L.; LI, H.; CHEN, F.; DI, B.; HE, L.; LIN, J.; TONG, S.; KONG, X.; DU, L.; HAO, P.; TANG, H.; BERNINI, A.; YUM, X.; SPIGA, O.; GUO, Z.; PAN, H.; HE, W.; MANUGUERRA, J.; FONTANET, A.; DANCHIN, A.; NICCOLAI, N.; LI, Y.; WU, C.; ZHAO, G. Cross-host evolution of severe acute respiratory syndrome coronavirus in palm civet and human. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 7, p. 2430-2435, 2005.

SONG, D. S.; KANG, J. S. O.; HA, G. W.; YANG, J. S.; MOON, H. J.; JANG, Y. S.; PARK, B. K. Multiplex reverse transcription-PCR for rapid differential detection of porcine epidemic diarrhea virus, transmissible gastroenteritis virus and porcine group A rotavirus. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 18, p. 278-281, 2006.

STEPHENSON, C. B.; CASEBOLT, D. B.; GANGOPADHYAY, N. N. Phylogenetic analysis of a highly conserved region of the polymerase gene from 11 coronaviruses and development of a consensus polymerase chain reaction assay. **Virus Research**, v. 60, p. 181-189, 1999.

STEYER, A.; PRIJATELJ, M. P.; 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.; URASAWA, S. Diversity in rotavirus genomes. **Seminars in Virology**, v. 6, n. 2, p. 123-131, 1995.

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

TARAPOREWALA, Z. F.; PATTON, J. T. Identification and characterization of the helix-destabilizing activity of rotavirus non-structural protein NSP2. **Journal of Virology**, v. 75, p. 4519-4527, 2001.

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

TIHOVA, M.; DRYDEN, K. A.; BELLAMY, A. R.; GREENBERG, H. B.; YEAGER, M. Localization of membrane permeabilization and receptor binding sites on the VP4 hemagglutinin of rotavirus: implications for cell entry. **Journal of Molecular Biology**, v. 314, p. 985-992, 2011.

TÔ, T. L.; WARD L. A.; YUAN L.; SAIF L. J. Serum and intestinal isotype antibody responses and correlates of protective immunity to human rotavirus in a gnotobiotic pig model of disease. **Journal of General Virology**, v. 79, p. 2661-2672, 1998.

TUSSEL, S. M.; SCHITTONE, S. A.; HOLMES, K. V. Mutational analysis of aminopeptidase N, a receptor for several group 1 coronaviruses, identifies keys determinants of viral host range. **Journal of Virology**, v. 81, p. 1261-73, 2007.

VASQUEZ-DEL CARPIO, R.; GONZALEZ-NILO, F. D.; RIADI, G.; TARAPOREWALA, Z. F.; PATTON, J. T. Histidine triad-like motif of the rotavirus NSP2 octamer mediates both RTPase and NTPase activities. **Journal of Molecular Biology**, v. 362, p. 539-554, 2006.

VELLENGA, L.; EGBERTS, H. J.; WENSING, T.; VAN DIJK, J. E.; MOUWEN, J. M.; BREUKINK, H. J. Intestinal permeability in pigs during rotavirus infection. **American Journal Veterinary Research**, v. 53, p. 1180-1183, 1992.

VENNEMA, H.; GODEKE, G. J.; ROSSEN, J. W.; VOORHOUT, W. F.; HORZINEK, M. C.; OPSTELTEN, D. J.; ROTTIER, P. J. Nucleocapsid-independent assembly of coronavirus-like particles by co-expression of viral envelope protein genes. **EMBO Journal**, v. 15, n. 8, p. 2020-2028, 1996.

VERSTEEG, G. A.; BREDENBEEK, P. J.; VAN DEN WORM, S. H.; SPAAN, W. J. Group 2 coronaviruses prevent immediate early interferon induction by protection of viral RNA from host cell recognition. **Virology**, v. 361, p. 18-26, 2007.

VLASAK, R.; LUYTJES, W.; SPAAN, W.; PALESE, P. Human and bovine coronaviruses recognize sialic acid-containing receptors similar to those of influenza C viruses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 85, n. 12, p. 4526-4529, 1988.

WALTER, R. **Umweltvirologie**. Viena: Springer-Verlag Wien, 2001. 266 p.

WANG, L.; JUNKER, D.; COLLISON, E. W. Evidence of natural recombination within the S1 gene of the infectious bronchitis virus. **Virology**, v. 192, p. 710-716, 1993.

WARD, R.; MCNEAL, M.; STEELE, A. D. Why does the world need another rotavirus vaccine? **Journal of Therapeutics and Clinical Risk Management**, v. 4, p. 49-63, 2008.

WEISS, S. R.; NAVAS-MARTIN, S. Coronavirus pathogenesis and the emerging pathogen severe acute respiratory syndrome coronavirus. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 69, n. 4, p. 635-664, 2005.

WESLEY, R. D.; WOODS, R. D.; CHEUNG, A. K. Genetic analysis of porcine respiratory coronavirus, an attenuated variant of transmissible gastroenteritis virus. **Journal of Virology**, v. 65, p. 3369-3373, 1991.

WIELER, L. H.; ILIEFF, A.; HERBST, W.; BAUER, C.; VIELER, E.; BAUERFEIND, R.; FAILING, K.; KLÖS, H.; WENGERT, D.; BALJER, G.; ZAHNER, H. Prevalence of enteropathogens in suckling and weaned piglets with diarrhoea in southern Germany. **Journal of Veterinary Medicine Series B Infectious Diseases and Veterinary Public Health**, v. 48, n. 2, p. 151-159, 2001.

WOO, P. C. Y.; LAU, S. K. P.; HUANG, Y.; YUEN, K. Coronavirus diversity, phylogeny and interspecies jumping. **Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 234, p. 1117-1127, 2009.

WORLD ANIMAL HEALTH INFORMATION DATABASE (WAHID). In: **World Organization for Animal Health (OIE)**. Disponível em: <http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/Diseasedistributionmap>. Acesso em: 20 jan. 2013.

XU, L.; HARBOUR, D.; MCCRAE, M. The application of polymerase chain reaction to the detection of rotavirus in faeces. **Journal of Virology Methods**, v. 27, n. 1, p. 29-37, 1990.

XU, A.; BELLAMY, A. R.; TAYLOR, J. A. Immobilization of the early secretory pathway by a vírus glycoprotein that binds to microtubules. **EMBO Journal**, v. 19, p. 6465-6474, 2000.

YE, Y.; HAUNS, K.; LANGLAND, J. O.; JACOBS, B. L.; HOGUE, B. G. Mouse hepatitis coronavirus A59 nucleocapsid protein is a type I interferon antagonist. **Journal of Virology**, v. 81, p. 2554–2563, 2007.

YUAN, L.; KANG, S. Y.; WARD, L. A.; TO, T. L.; SAIF, L. J. Antibody-secreting cell responses and protective immunity assessed in gnotobiotic pigs inoculated orally or intramuscularly with inactivated human rotavirus. **Journal of Virology**, v. 72, n. 1, p. 330–338, 1998.

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 na infant in Belgium. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, p. 1492-1500, 2012.

ZENG, C. Q.; ESTES, M. K.; CHARPILLENNE, A.; COHEN, J. The N-terminus of rotavirus VP2 is necessary for encapsidation of VP1 and VP3. **Journal of Virology**, v. 72, p. 201-208, 1998.

ZHAI, Y.; SUN, F.; LI, X.; PANG, H.; XU, X.; BARTLAM, M.; RAO Z. Insights into SARS-CoV transcription and replication from the structure of the nsp7-nsp8 hexadecamer. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 12, n. 11, p. 980-986, 2005.

ZHANG, X.; HASOKSUZ, M.; SPIRO, D.; HALPIN, R.; WANG, S.; STOLLAR, S.; JANIES, D.; HADYA, N.; TANG, Y.; GHEDIN, E.; SAIF, L. Complete Genomic sequences, a key residue in the spike protein and deletions in non-structural protein 3b of US strains of virulent and attenuated coronaviruses, transmissible gastroenteritis virus and porcine respiratory coronavirus. **Virology**, v. 358, n. 2, p. 424-435, 2007a.

ZHANG, X.; HASOKSUZ, M.; SPIRO, D.; HALPIN, R.; WANG, S.; VLASOVA A.; JANIES, D.; JONES, L. R.; GHEDIN, E.; SAIF, L. J. Quasispecies of bovine enteric and respiratory coronaviruses based on complete genome sequences and genetic changes after tissue culture adaptation. **Virology**, v. 363, n. 1, p. 1-10, 2007b.

ZHAO, J.; FALCÓN, A.; ZHOU, H.; NETLAND, J.; ENJUANES, L.; BREÑA, P. P.; PERLMAN, S. Severe acute respiratory syndrome coronavirus protein 6 Is required for optimal replication. **Journal of Virology**, v. 83, n. 5, p. 2368-2373, 2009.

APÊNDICE

Apêndice A – Matriz de identidade referente ao alinhamento de um fragmento parcial de 253 aminoácidos traduzidos a partir do gene codificador da proteína VP7 de rotavírus suínos. As áreas em branco representam as identidades nucleotídicas, e as cinzas, as identidades de aminoácidos

	PGRV1	PGRV2	PGRV4	PGRV5	PGRV6	PGRV7	PGRV8	PGRV9	PGRV10	PGRV12	PGRV19	PGRV20	L35079	HQ268836	D86271	FJ947513	FJ998278	GU296430	AF427124	GU827411	EU708961	L35055
PGRV1	ID	0,996	0,996	0,996	0,996	0,996	0,992	0,992	0,92	0,932	0,984	0,984	0,932	0,944	0,924	0,924	0,92	0,913	0,932	0,932	0,936	0,948
PGRV2	0,998	ID	1	1	1	1	0,996	0,996	0,924	0,936	0,988	0,988	0,936	0,948	0,928	0,928	0,924	0,916	0,936	0,936	0,94	0,952
PGRV4	0,994	0,996	ID	1	1	1	0,996	0,996	0,924	0,936	0,988	0,988	0,936	0,948	0,928	0,928	0,924	0,916	0,936	0,936	0,94	0,952
PGRV5	0,998	1	0,996	ID	1	1	0,996	0,996	0,924	0,936	0,988	0,988	0,936	0,948	0,928	0,928	0,924	0,916	0,936	0,936	0,94	0,952
PGRV6	0,998	1	0,996	1	ID	1	0,996	0,996	0,924	0,936	0,988	0,988	0,936	0,948	0,928	0,928	0,924	0,916	0,936	0,936	0,94	0,952
PGRV7	0,998	1	0,996	1	1	ID	0,996	0,996	0,924	0,936	0,988	0,988	0,936	0,948	0,928	0,928	0,924	0,916	0,936	0,936	0,94	0,952
PGRV8	0,997	0,998	0,994	0,998	0,998	0,998	ID	0,992	0,92	0,932	0,984	0,984	0,932	0,944	0,924	0,924	0,92	0,913	0,932	0,932	0,936	0,948
PGRV9	0,997	0,998	0,994	0,998	0,998	0,998	0,997	ID	0,92	0,932	0,984	0,984	0,932	0,948	0,924	0,924	0,92	0,913	0,932	0,932	0,94	0,948
PGRV10	0,911	0,913	0,911	0,913	0,913	0,913	0,911	0,911	ID	0,988	0,928	0,928	0,928	0,94	0,913	0,916	0,909	0,893	0,936	0,913	0,924	0,92
PGRV12	0,915	0,916	0,915	0,916	0,916	0,916	0,915	0,915	0,992	ID	0,94	0,94	0,94	0,952	0,924	0,928	0,92	0,905	0,948	0,924	0,936	0,932
PGRV19	0,964	0,965	0,961	0,965	0,965	0,965	0,964	0,964	0,915	0,92	ID	1	0,94	0,952	0,932	0,924	0,928	0,924	0,94	0,94	0,944	0,956
PGRV20	0,964	0,965	0,961	0,965	0,965	0,965	0,964	0,964	0,915	0,92	1	ID	0,94	0,952	0,932	0,924	0,928	0,924	0,94	0,94	0,944	0,956
L35079	0,866	0,868	0,872	0,868	0,868	0,868	0,866	0,866	0,89	0,894	0,87	0,87	ID	0,952	0,952	0,936	0,944	0,913	0,96	0,944	0,956	0,956
HQ268836	0,874	0,876	0,877	0,876	0,876	0,876	0,874	0,874	0,884	0,888	0,874	0,874	0,881	ID	0,944	0,936	0,94	0,924	0,96	0,944	0,956	0,948
D86271	0,864	0,865	0,866	0,865	0,865	0,865	0,864	0,864	0,88	0,884	0,872	0,872	0,881	0,89	ID	0,972	0,98	0,928	0,96	0,96	0,964	0,94
FJ947513	0,86	0,861	0,862	0,861	0,861	0,861	0,86	0,86	0,872	0,876	0,86	0,86	0,865	0,877	0,94	ID	0,976	0,916	0,952	0,948	0,952	0,924
FJ998278	0,865	0,866	0,868	0,866	0,866	0,866	0,865	0,865	0,876	0,88	0,876	0,876	0,877	0,886	0,968	0,948	ID	0,924	0,956	0,956	0,96	0,932
GU296430	0,851	0,852	0,853	0,852	0,852	0,852	0,851	0,851	0,844	0,848	0,855	0,855	0,859	0,865	0,898	0,882	0,894	ID	0,928	0,944	0,948	0,916
AF427124	0,864	0,865	0,865	0,865	0,865	0,865	0,864	0,864	0,874	0,878	0,87	0,87	0,876	0,935	0,888	0,877	0,88	0,878	ID	0,952	0,956	0,932
GU827411	0,87	0,872	0,873	0,872	0,872	0,872	0,87	0,87	0,861	0,865	0,873	0,873	0,87	0,87	0,906	0,899	0,91	0,947	0,872	ID	0,972	0,948
EU708961	0,868	0,869	0,87	0,869	0,869	0,869	0,868	0,868	0,86	0,866	0,878	0,878	0,87	0,874	0,905	0,898	0,909	0,932	0,87	0,953	ID	0,944
L35055	0,888	0,889	0,893	0,889	0,889	0,889	0,888	0,888	0,884	0,888	0,886	0,886	0,924	0,873	0,866	0,855	0,864	0,856	0,868	0,86	0,856	ID

Apêndice B – Matriz de identidade referente ao alinhamento de um fragmento parcial de 191 aminoácidos traduzidos a partir do gene codificador da proteína VP7 de rotavírus suínos. As áreas em branco representam as identidades nucleotídicas, e as cinzas, as identidades de aminoácidos

	PGRV13	PGRV14	PGRV15	PGRV16	PGRV17	PGRV18	PIGSP1	PIGSP2	PIGSP3	DQ494393	DQ494394	L35059	DQ062572	DQ813658
PGRV13	ID	0,879	0,884	0,884	0,874	0,884	0,863	0,884	0,884	0,9	0,905	0,916	0,931	0,942
PGRV14	0,811	ID	0,994	0,994	0,984	0,994	0,973	0,994	0,994	0,905	0,91	0,91	0,921	0,921
PGRV15	0,815	0,993	ID	1	0,989	1	0,979	1	1	0,91	0,916	0,916	0,926	0,926
PGRV16	0,816	0,994	0,998	ID	0,989	1	0,979	1	1	0,91	0,916	0,916	0,926	0,926
PGRV17	0,811	0,989	0,993	0,994	ID	0,989	0,968	0,989	0,989	0,9	0,905	0,905	0,916	0,916
PGRV18	0,816	0,994	0,998	1	0,994	ID	0,979	1	1	0,91	0,916	0,916	0,926	0,926
PIGSP1	0,806	0,98	0,984	0,986	0,98	0,986	ID	0,979	0,979	0,89	0,895	0,895	0,905	0,905
PIGSP2	0,816	0,994	0,998	1	0,994	1	0,986	ID	1	0,91	0,916	0,916	0,926	0,926
PIGSP3	0,816	0,994	0,998	1	0,994	1	0,986	1	ID	0,91	0,916	0,916	0,926	0,926
DQ494393	0,828	0,909	0,91	0,91	0,905	0,91	0,897	0,91	0,91	ID	0,994	0,937	0,926	0,942
DQ494394	0,83	0,91	0,912	0,912	0,907	0,912	0,898	0,912	0,912	0,998	ID	0,942	0,931	0,947
L35059	0,825	0,89	0,895	0,895	0,89	0,895	0,884	0,895	0,895	0,942	0,944	ID	0,942	0,958
DQ062572	0,83	0,886	0,891	0,891	0,886	0,891	0,879	0,891	0,891	0,905	0,907	0,905	ID	0,963
DQ813658	0,839	0,858	0,863	0,863	0,858	0,863	0,851	0,863	0,863	0,881	0,883	0,874	0,886	ID

Apêndice C – Matriz de identidade referente ao alinhamento de um fragmento parcial de 263 aminoácidos traduzidos a partir do gene codificador da proteína VP7 de rotavírus suínos. As áreas em branco representam as identidades nucleotídicas, e as cinzas, as identidades de aminoácidos

	PGRV11	PGRV21	AF060487	EF672623	EF990708	AB180970	FJ361209	D38053	D38055
PGRV11	ID	0,98	0,961	0,946	0,961	0,95	0,931	0,958	0,92
PGRV21	0,956	ID	0,961	0,946	0,965	0,95	0,931	0,958	0,92
AF060487	0,93	0,925	ID	0,946	0,992	0,95	0,923	0,973	0,935
EF672623	0,879	0,889	0,88	ID	0,946	0,973	0,923	0,942	0,904
EF990708	0,931	0,927	0,988	0,884	ID	0,95	0,923	0,973	0,935
AB180970	0,879	0,889	0,878	0,984	0,882	ID	0,923	0,946	0,908
FJ361209	0,884	0,888	0,877	0,882	0,878	0,888	ID	0,923	0,882
D38053	0,931	0,929	0,963	0,887	0,969	0,884	0,878	ID	0,939
D38055	0,913	0,908	0,946	0,871	0,953	0,871	0,861	0,963	ID

Apêndice D – Matriz de identidade referente ao alinhamento de um fragmento parcial de 233 aminoácidos traduzidos a partir do gene codificador da proteína VP4 de rotavírus suínos. As áreas em branco representam as identidades nucleotídicas, e as cinzas, as identidades de aminoácidos

	PGRV29	PGRV32	PGRV33	PGRV34	L33895	DQ490554	EF059920	EF059921	M33516	DQ490548
PGRV29	ID	0,944	0,948	0,948	0,879	0,892	0,892	0,892	0,824	0,892
PGRV32	0,942	ID	0,995	0,995	0,896	0,905	0,896	0,896	0,828	0,905
PGRV33	0,944	0,998	ID	1	0,901	0,909	0,901	0,901	0,832	0,909
PGRV34	0,944	0,998	1	ID	0,901	0,909	0,901	0,901	0,832	0,909
L33895	0,891	0,899	0,901	0,901	ID	0,944	0,922	0,922	0,785	0,944
DQ490554	0,892	0,892	0,894	0,894	0,954	ID	0,969	0,969	0,798	0,995
EF059920	0,884	0,882	0,884	0,884	0,942	0,979	ID	1	0,802	0,965
EF059921	0,885	0,884	0,885	0,885	0,944	0,981	0,998	ID	0,802	0,965
M33516	0,806	0,804	0,805	0,805	0,785	0,798	0,798	0,799	ID	0,802
DQ490548	0,891	0,891	0,892	0,892	0,957	0,995	0,978	0,979	0,798	ID

Apêndice E – Matriz de identidade referente ao alinhamento de um fragmento parcial de 181 aminoácidos traduzidos a partir do gene codificador da proteína VP4 de rotavírus suínos. As áreas em branco representam as identidades nucleotídicas, e as cinzas, as identidades de aminoácidos

	PGRV1	PGRV2	PGRV3	PGRV4	PGRV5	PGRV6	PGRV7	PGRV8	PGRV9	PGRV10	PGRV12	PGRV19	PGRV20	PGRV21	PGRV22	PGRV23	PGRV25	PGRV26	PGRV27	PGRV28	PGRV31	AB176690	AB176686	AY124576	AY124575	AF526374	DQ003290	DQ003291
PGRV1	ID	1	1	1	1	1	1	1	1	0,762	0,762	0,845	0,839	0,839	1	1	0,762	0,994	1	1	1	0,812	0,812	0,817	0,823	0,801	0,922	0,922
PGRV2	1	ID	1	1	1	1	1	1	1	0,762	0,762	0,845	0,839	0,839	1	1	0,762	0,994	1	1	1	0,812	0,812	0,817	0,823	0,801	0,922	0,922
PGRV3	1	1	ID	1	1	1	1	1	1	0,762	0,762	0,845	0,839	0,839	1	1	0,762	0,994	1	1	1	0,812	0,812	0,817	0,823	0,801	0,922	0,922
PGRV4	1	1	1	ID	1	1	1	1	1	0,762	0,762	0,845	0,839	0,839	1	1	0,762	0,994	1	1	1	0,812	0,812	0,817	0,823	0,801	0,922	0,922
PGRV5	1	1	1	1	ID	1	1	1	1	0,762	0,762	0,845	0,839	0,839	1	1	0,762	0,994	1	1	1	0,812	0,812	0,817	0,823	0,801	0,922	0,922
PGRV6	1	1	1	1	1	ID	1	1	1	0,762	0,762	0,845	0,839	0,839	1	1	0,762	0,994	1	1	1	0,812	0,812	0,817	0,823	0,801	0,922	0,922
PGRV7	1	1	1	1	1	1	ID	1	1	0,762	0,762	0,845	0,839	0,839	1	1	0,762	0,994	1	1	1	0,812	0,812	0,817	0,823	0,801	0,922	0,922
PGRV8	1	1	1	1	1	1	1	ID	1	0,762	0,762	0,845	0,839	0,839	1	1	0,762	0,994	1	1	1	0,812	0,812	0,817	0,823	0,801	0,922	0,922
PGRV9	1	1	1	1	1	1	1	1	ID	0,762	0,762	0,845	0,839	0,839	1	1	0,762	0,994	1	1	1	0,812	0,812	0,817	0,823	0,801	0,922	0,922
PGRV10	0,749	0,749	0,749	0,749	0,749	0,749	0,749	0,749	0,749	ID	1	0,773	0,767	0,767	0,762	0,762	1	0,762	0,762	0,762	0,762	0,79	0,79	0,74	0,745	0,74	0,751	0,751
PGRV12	0,749	0,749	0,749	0,749	0,749	0,749	0,749	0,749	0,749	1	ID	0,773	0,767	0,767	0,762	0,762	1	0,762	0,762	0,762	0,762	0,79	0,79	0,74	0,745	0,74	0,751	0,751
PGRV19	0,852	0,852	0,852	0,852	0,852	0,852	0,852	0,852	0,852	0,766	0,766	ID	0,994	0,994	0,845	0,845	0,773	0,839	0,845	0,845	0,845	0,817	0,817	0,801	0,812	0,79	0,856	0,856
PGRV20	0,85	0,85	0,85	0,85	0,85	0,85	0,85	0,85	0,85	0,764	0,764	0,998	ID	1	0,839	0,839	0,767	0,834	0,839	0,839	0,839	0,817	0,817	0,795	0,806	0,784	0,85	0,85
PGRV21	0,85	0,85	0,85	0,85	0,85	0,85	0,85	0,85	0,85	0,764	0,764	0,998	1	ID	0,839	0,839	0,767	0,834	0,839	0,839	0,839	0,817	0,817	0,795	0,806	0,784	0,85	0,85
PGRV22	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,749	0,749	0,852	0,85	0,85	ID	1	0,762	0,994	1	1	1	0,812	0,812	0,817	0,823	0,801	0,922	0,922
PGRV23	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,749	0,749	0,852	0,85	0,85	1	ID	0,762	0,994	1	1	1	0,812	0,812	0,817	0,823	0,801	0,922	0,922
PGRV25	0,749	0,749	0,749	0,749	0,749	0,749	0,749	0,749	0,749	1	1	0,766	0,764	0,764	0,749	0,749	ID	0,762	0,762	0,762	0,762	0,79	0,79	0,74	0,745	0,74	0,751	0,751
PGRV26	0,994	0,994	0,994	0,994	0,994	0,994	0,994	0,994	0,994	0,749	0,749	0,847	0,845	0,845	0,994	0,994	0,749	ID	0,994	0,994	0,994	0,806	0,806	0,812	0,817	0,795	0,917	0,917
PGRV27	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,749	0,749	0,852	0,85	0,85	1	1	0,749	0,994	ID	1	1	0,812	0,812	0,817	0,823	0,801	0,922	0,922
PGRV28	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,749	0,749	0,852	0,85	0,85	1	1	0,749	0,994	1	ID	1	0,812	0,812	0,817	0,823	0,801	0,922	0,922
PGRV31	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,749	0,749	0,852	0,85	0,85	1	1	0,749	0,994	1	1	ID	0,812	0,812	0,817	0,823	0,801	0,922	0,922
AB176690	0,784	0,784	0,784	0,784	0,784	0,784	0,784	0,784	0,784	0,775	0,775	0,788	0,79	0,79	0,784	0,784	0,775	0,78	0,784	0,784	0,784	ID	1	0,801	0,806	0,806	0,812	0,812
AB176686	0,784	0,784	0,784	0,784	0,784	0,784	0,784	0,784	0,784	0,775	0,775	0,79	0,791	0,791	0,784	0,784	0,775	0,78	0,784	0,784	0,784	0,998	ID	0,801	0,806	0,806	0,812	0,812
AY124576	0,786	0,786	0,786	0,786	0,786	0,786	0,786	0,786	0,786	0,76	0,76	0,799	0,797	0,797	0,786	0,786	0,76	0,78	0,786	0,786	0,786	0,819	0,819	ID	0,988	0,801	0,801	0,801
AY124575	0,786	0,786	0,786	0,786	0,786	0,786	0,786	0,786	0,786	0,758	0,758	0,804	0,802	0,802	0,786	0,786	0,758	0,78	0,786	0,786	0,786	0,821	0,821	0,994	ID	0,806	0,812	0,812
AF526374	0,777	0,777	0,777	0,777	0,777	0,777	0,777	0,777	0,777	0,725	0,725	0,775	0,773	0,773	0,777	0,777	0,725	0,771	0,777	0,777	0,777	0,795	0,795	0,819	0,821	ID	0,801	0,801
DQ003290	0,896	0,896	0,896	0,896	0,896	0,896	0,896	0,896	0,896	0,762	0,762	0,85	0,848	0,848	0,896	0,896	0,762	0,891	0,896	0,896	0,896	0,797	0,799	0,791	0,793	0,79	ID	1
DQ003291	0,896	0,896	0,896	0,896	0,896	0,896	0,896	0,896	0,896	0,762	0,762	0,85	0,848	0,848	0,896	0,896	0,762	0,891	0,896	0,896	0,896	0,797	0,799	0,791	0,793	0,79	1	ID

Apêndice F – Matriz de identidade referente ao alinhamento de um fragmento parcial de 169 aminoácidos traduzidos a partir do gene codificador da proteína VP4 de rotavírus suínos. As áreas em branco representam as identidades nucleotídicas, e as cinzas, as identidades de aminoácidos

	PGRV11	PGRV13	PGRV14	PGRV15	PGRV16	PGRV17	PGRV18	PGRV24	PGRV30	AY768809	AY174094	HQ268847
PGRV11	ID	0,917	0,917	0,917	0,917	0,917	0,917	0,934	0,923	0,952	0,946	0,923
PGRV13	0,846	ID	0,94	0,94	0,94	0,94	0,94	0,917	0,899	0,911	0,923	0,928
PGRV14	0,838	0,958	ID	1	1	1	1	0,917	0,887	0,911	0,923	0,94
PGRV15	0,838	0,958	1	ID	1	1	1	0,917	0,887	0,911	0,923	0,94
PGRV16	0,838	0,958	1	1	ID	1	1	0,917	0,887	0,911	0,923	0,94
PGRV17	0,838	0,958	1	1	1	ID	1	0,917	0,887	0,911	0,923	0,94
PGRV18	0,84	0,956	0,998	0,998	0,998	0,998	ID	0,917	0,887	0,911	0,923	0,94
PGRV24	0,934	0,836	0,836	0,836	0,836	0,836	0,838	ID	0,97	0,917	0,923	0,911
PGRV30	0,915	0,824	0,81	0,81	0,81	0,81	0,812	0,96	ID	0,905	0,905	0,887
AY768809	0,893	0,85	0,842	0,842	0,842	0,842	0,84	0,871	0,871	ID	0,958	0,928
AY174094	0,911	0,842	0,838	0,838	0,838	0,838	0,836	0,901	0,889	0,901	ID	0,934
HQ268847	0,854	0,885	0,881	0,881	0,881	0,881	0,879	0,83	0,826	0,84	0,844	ID

ANEXOS

Anexo A

Sequências nucleotídicas do gene codificador da VP7 dos rotavírus geradas neste estudo (números de acesso *Genbank* serão disponibilizados publicamente após processamento):

>PGRV1/ ITÚ

```
ACCTTTTGTGATATCGGTTATATTATTGAATTACATACTCAAATCATTAAACCAGAAT
AATGGACTTCATTATCTACAGATTTCTATTAATGTGATAATACTGTCACCATTTC
TTAATGCACAAAATTACGGAATAAATCTTCCAATTACTGGATCGATGGATACTC
ATATGCAAATTCAACACAAGAGGAAACATTTTAAACATCAACTTTATGCTTATAT
TATCCAAGTGAAGCAGCAAGAGAAATAAATGATAATTCGTGGAAAGATACACTT
TCTCAATTATTTTAACTAAAGGATGGCCAACAGGATCTGTATATTTCAAAGATTA
CGCAGATATTGCCTCGTTTTTCAGTTGATCCTCAATTATACTGCGATTACAATCTAG
TGATAATGAAATATGACGCTACACTACAAGTAGATATGTCAGAGTTGGCAGATTT
GATACTTAATGAATGGTTGTGTAATCCTATGGATATTACATTATATTATTATCAAC
AAACTGATGAGGCGAATAAATGGATTTCAATGGGATCATCTTGTACTATAAAAGT
ATGTCCATTAAATACGCAAACATTGGGAATTGGGTGCCTAACTACTGACACAAAT
ACATTTGAAGAGATTGCAACGGCTGAAAACTAGCGATCACTGATGTTGTGGATG
GAGTCAATCACAACTGAGTGTTACAACGGATACTTGTACGATTAAAAATTGTAA
AAAAGTAGGACCAAGAGAGAACGTAGCAGTCATACAGGTAGGCGGTTTCAGATAT
ACTAGACATAACAGCTGATCCAACAACAGCACCACAAACAGAAAGAATGATGCG
AGTGAAGTGAAGAAATGGTGGCAAGTTTTTTACACAATAGTAGATTACGTAAAT
CAAATCGTGCAACCAATGTCCAAGAGATCTAGATCACTAACTCCGCTGC
```

> PGRV2/ ITÚ

```
TATACCACAGTTTTAACCTTTTTGATATCGGTTATATTATTGAATTACATACTCAA
ATCATTAAACCAGAATAATGGACTTCATTATCTACAGATTTCTATTAATTGTGATAA
TACTGTCACCATTCTTAATGCACAAAATTACGGAATAAATCTTCCAATTACTGGA
TCGATGGATACTCCATATGCAAATTCAACACAAGAGGAAACATTTTAAACATCAA
CTTTATGCTTATATTATCCAAGTGAAGCAGCAAGAGAAATAAATGATAATTCGTG
GAAAGATACACTTTCTCAATTATTTTAACTAAAGGATGGCCAACAGGATCTGTA
TATTTCAAAGATTACGCAGATATTGCCTCGTTTTTCAGTTGATCCTCAATTATACTG
```

CGATTACAATCTAGTGATAATGAAATATGACGCTACACTACAACCTAGATATGTCA
 GAGTTGGCAGATTTGATACTTAATGAATGGTTGTGTAATCCTATGGATATTACATT
 ATATTATTATCAACAACTGATGAGGCGAATAAATGGATTTCAATGGGATCATCT
 TGTACTATAAAAAGTATGTCCATTAAATACGCAAACATTGGGAATTGGGTGCCTAA
 CTACTGACACAAATACATTTGAAGAGATTGCAACGGCTGAAAACTAGCGATCA
 CTGATGTTGTGGATGGAGTCAATCACAACTGAGTGTTACAACGGATACTTGTAC
 GATTA AAAAATTGTAAAAAACTAGGACCAAGAGAGAACGTAGCAGTCATACAGGT
 AGGCGGTTTCAGATATACTAGACATAACAGCTGATCCAACAGCAGCACCACAAAC
 AGAAAGAATGATGCGAGTGAACCTGGAAGAAATGGTGGCAAGTTTTTTTACACAAT
 AGTAGATTACGTAAATCAAATCGTGCAAACAATGTCCAAGAGATCTAT

> PGRV3/ ITÚ

ATGTGATAATACTGTCACCATTTCTTAATGCACAAAATTACGGAATAAATCTTCC
 AATTACTGGATCGATGGATACTCCATATGCAAATTCAACACAAGAGGAAACATTT
 TTAACATCAACTTTATGCTTATATTATCCAACCTGAAGCAGCAAGAGAAATAAATG
 ATAATTCGTGGAAAGATACACTTTCTCAATTATTTTAACTAAAGGATGGCCAAC
 AGGATCTGTATATTTCAAAGATTACGCAGATATTGCCTCGTTTTTCAGTTGATCCTC
 AATTATACTGCGATTACAATCTAGTGATAATGAAATATGACGCTACACTACAAC
 AGATATGTCAGAGTTGGCAGATTTGATACTTAATGAATGGTTGTGTAATCCTATG
 GATATTACATTATATTATTATCAACAACTGATGAGGCGAATAAATGGATTTCAA
 TGGGATCATCTTGTACTATAAAAAGTATGTCCATTAAATACGCAAACATTGGGAAT
 TGGGTGCCTAACTACTGACACAAATACATTTGAAGAGATTGCAACGGCTGAAAA
 ACTAGCGATCACTGATGTTGTGGATGGAGTCAATCACAACTGAGTGTTACAACG
 GATACTTGTACGATTAAAAATTGTAAAAAACTAGGACCAAGAGAGAACGTAGCA
 GTCATACAGGTAGGCGGTTTCAGATATACTGGTCACATCAGACAACCTCTA

> PGRV4/ ITÚ

ATATACCACAGTCTTAACCTTTTTTGATATCGGTTATATTATTGAATTACATACTCA
 AATCATTAACCAGAATAATGGACTTCATTATCTACAGATTTCTATTAATTGTGATA
 ATACTGTCACCATTTCTTAATGCACAAAATTACGGAATAAATCTTCCAATTACTGG
 ATCGATGGATACTCCATATGCAAATTCAACACAAGAGGAAACATTTTTTAACATCA
 ACTTTATGCTTATATTATCCAACCTGAAGCAGCAAGAGAAATAAATGATAATTCGT
 GGAAAGATACACTTTCTCAATTATTTTAACTAAAGGATGGCCAACAGGATCTGT
 ATATTTCAAAGATTACGCAGATATTGCCTCGTTTTTCAGTTGATCCTCAATTATACT
 GCGATTACAATTTAGTGATAATGAAATATGACGCTACACTACAACCTAGATATGTC
 AGAGTTGGCAGATTTGATACTTAATGAATGGTTGTGTAATCCTATGGATATTACA
 TTATATTATTATCAACAACTGATGAGGCGAATAAATGGATTTCAATGGGATCAT
 CTTGTACTATAAAAAGTATGTCCATTAAATACGCAAACATTGGGAATTGGGTGCCT
 AACTACTGACACAAATACATTTGAAGAGATTGCAACGGCTGAAAACTAGCGAT
 CACTGATGTTGTGGATGGAGTCAATCACAACTGAGTGTTACGACGGATACTTGT
 ACGATTAAAAATTGTAAAAAACTAGGACCAAGAGAGAACGTAGCAGTCATACAA
 GTAGC

> PGRV5/ ITÚ

ATATACCACAGTTTTTAACCTTTTTTGATATCGGTTATATTATTGAATTACATACTCA
 AATCATTAACCAGAATAATGGACTTCATTATCTACAGATTTCTATTAATTGTGATA
 ATACTGTCACCATTTCTTAATGCACAAAATTACGGAATAAATCTTCCAATTACTGG
 ATCGATGGATACTCCATATGCAAATTCAACACAAGAGGAAACATTTTTTAACATCA
 ACTTTATGCTTATATTATCCAACCTGAAGCAGCAAGAGAAATAAATGATAATTCGT
 GGAAAGATACACTTTCTCAATTATTTTAACTAAAGGATGGCCAACAGGATCTGT

ATATTTCAAAGATTACGCAGATATTGCCTCGTTTTTCAGTTGATCCTCAATTATACT
 GCGATTACAATCTAGTGATAATGAAATATGACGCTACACTACAACCTAGATATGTC
 AGAGTTGGCAGATTTGATACTTAATGAATGGTTGTGTAATCCTATGGATATTACA
 TTATATTATTATCAACAACTGATGAGGCGAATAAATGGATTTCAATGGGATCAT
 CTTGTACTATAAAAAGTATGTCCATTAAATACGCAAACATTGGGAATTGGGTGCCT
 AACTACTGACACAAATACATTTGAAGAGATTGCAACGGCTGAAAACTAGCGAT
 CACTGATGTTGTGGATGGAGTCAATCACAACTGAGTGTTACAACGGATACTTGT
 ACGATTAAAAAATTGTAAAAAACTAGGACCAAGAGAGAACGTAGCAGTCATACAG
 GTAGGCGGTTTCAGATATACTAGACATAACAGCTGATCCAACAACAGCACCACAA
 ACAGAAAGAATGATGCGAGTGAACCTGGAAGAAATGGTGGCAAGTTTTTTACACA
 ATAGTTGATTACGTAAATCAAATCGTGCAAACAATGTCCAAGAGATT

> PGRV6/ ITÚ

TATTGAATATAACCACAGTTTTTAACCTTTTTTGATATCGGTTATATTATTGAATTACA
 TACTCAAATCATTAAACCAGAATAATGGACTTCATTATCTACAGATTTCTATTAATT
 GTGATAATACTGTCACCATTCTTAATGCACAAAATTACGGAATAAATCTTCCAA
 TTACTGGATCGATGGATACTCCATATGCAAATTCAACACAAGAGGAAACATTTTT
 AACATCAACTTTATGCTTATATTATCCAACCTGAAGCAGCAAGAGAAATAAATGAT
 AATTCGTGGAAAGATACACTTTCTCAATTATTTTTAACTAAAGGATGGCCAACAG
 GATCTGTATATTTCAAAGATTACGCAGATATTGCCTCGTTTTTCAGTTGATCCTCAA
 TTATACTGCGATTACAATCTAGTGATAATGAAATATGACGCTACACTACAACCTAG
 ATATGTCAGAGTTGGCAGATTTGATACTTAATGAATGGTTGTGTAATCCTATGGA
 TATTACATTATATTATTATCAACAACTGATGAGGCGAATAAATGGATTTCAATG
 GGATCATCTTGTACTATAAAAAGTATGTCCATTAAATACGCAAACATTGGGAATTG
 GGTGCCTAACTACTGACACAAATACATTTGAAGAGATTGCAACGGCTGAAAACT
 AGCGATCACTGATGTTGTGGATGGAGTCAATCACAACTGAGTGTTACAACGGAT
 ACTTGTACGATTAAAAAATTGTAAAAAACTAGGACCAAGAGAGAACGTAGCAGTC
 ATACAGGTAGGCGGTTTCAGATATACTAGACATAACAGCTGATCCAACAACAGCA
 CCACAAACAGAAAGAATGATGCGAGTGAACCTGGAAGAAATGGTGGCAAGTTTTTT
 TACACAATAGTTGATTACGTAAATCAAATCGTGCAAACAATGTCCAAGAGATCTA
 GA

> PGRV7/ ITÚ

ACAGTTTTAACCTTTTTTGATATCGGTTATATTATTGAATTACATACTCAAATCATT
 AACCAGAATAATGGACTTCATTATCTACAGATTTCTATTAATTGTGATAATACTGT
 CACCATTCTTAATGCACAAAATTACGGAATAAATCTTCCAATTACTGGATCGAT
 GGATACTCCATATGCAAATTCAACACAAGAGGAAACATTTTTAACATCAACTTTA
 TGCTTATATTATCCAACCTGAAGCAGCAAGAGAAATAAATGATAATTCGTGGAAAG
 ATACACTTTCTCAATTATTTTTAACTAAAGGATGGCCAACAGGATCTGTATATTTT
 AAAGATTACGCAGATATTGCCTCGTTTTTCAGTTGATCCTCAATTATACTGCGATTA
 CAATCTAGTGATAATGAAATATGACGCTACACTACAACCTAGATATGTCAGAGTTG
 GCAGATTTGATACTTAATGAATGGTTGTGTAATCCTATGGATATTACATTATATTA
 TTATCAACAACTGATGAGGCGAATAAATGGATTTCAATGGGATCATCTTGTACT
 ATAAAAGTATGTCCATTAAATACGCAAACATTGGGAATTGGGTGCCTAACTACTG
 ACACAAATACATTTGAAGAGATTGCAACGGCTGAAAACTAGCGATCACTGATG
 TTGTGGATGGAGTCAATCACAACTGAGTGTTACAACGGATACTTGTACGATTAA
 AAATTGTAAAAAACTAGGACCAAGAGAGAACGTAGCAGTCATACAGGTAGGCGG
 TTCAGATATACTAGACATAACAGCTGATCCAACAACAGCACCACAAACAGAAAG
 AATGATGCGAGTGAACCTGGAAGAAATGGTGGCAAGTTTTTTTACACAATAGTTGAT
 TACGTAAATCAAATCGTGCAAACAATGTCCAAGAGATCT

> PGRV8/ ITÚ

ACCTTTTTGATATCGGTTATATTATTGAATTACATACTCAAATCATTAACCAGAAT
 AATGGACTTCCTTATCTACAGATTTCTATTAATTGTGATAATACTGTCACCATTTCT
 TTAATGCACAAAATTACGGAATAAATCTTCCAATTACTGGATCGATGGATACTCC
 ATATGCAAATTCAACACAAGAGGAAACATTTTTAACATCAACTTTATGCTTATAT
 TATCCAACCTGAAGCAGCAAGAGAAATAAATGATAATTCGTGGAAAGATACACTT
 TCTCAATTATTTTTAACTAAAGGATGGCCAACAGGATCTGTATATTTCAAAGATTA
 CGCAGATATTGCCTCGTTTTTCAGTTGATCCTCAATTATACTGCGATTACAATCTAG
 TGATAATGAAATATGACGCTACACTACAACCTAGATATGTCAGAGTTGGCAGATTT
 GATACTTAATGAATGGTTGTGTAATCCTATGGATATTACATTATATTATTATCAAC
 AAAGTATGAGGCGAATAAATGGATTTCAATGGGATCATCTTGTACTATAAAAGT
 ATGTCCATTAAATACGCAAACATTGGGAATTGGGTGCCTAACTACTGACACAAAT
 ACATTTGAAGAGATTGCAACGGCTGAAAACTAGCGATCACTGATGTTGTGGATG
 GAGTCAATCACAACTGAGTGTTACAACGGATACTTGTACGATTAAAAATTGTAA
 AAACTAGGACCAAGAGAGAACGTAGCAGTCATACAGGTAGGCGGTTTCAGATAT
 ACTAGACATAACAGCTGATCCAACAACAGCACCACAAACAGAAAGAATGATGCG
 AGTGAAGTGGAAAGAAATGGTGGCAAGTTTTTTACACAATAGTTGATTACGTAAAT
 CAAATCGTGCAAACAATGTCCAAGAGAT

> PGRV9/ ITÚ

TATACCACAGTTTTTAACCTTTTTGATATCGGTTACATTATTGAATTACATACTCAA
 ATCATTAACCAGAATAATGGACTTCATTATCTACAGATTTCTATTAATTGTGATAA
 TACTGTCACCATTTCTTAATGCACAAAATTACGGAATAAATCTTCCAATTACTGGA
 TCGATGGATACTCCATATGCAAATTCAACACAAGAGGAAACATTTTTAACATCAA
 CTTTATGCTTATATTATCCAACCTGAAGCAGCAAGAGAAATAAATGATAATTCGTG
 GAAAGATACACTTTCTCAATTATTTTTAACTAAAGGATGGCCAACAGGATCTGTA
 TATTTCAAAGATTACGCAGATATTGCCTCGTTTTTCAGTTGATCCTCAATTATACTG
 CGATTACAATCTAGTGATAATGAAATATGACGCTACACTACAACCTAGATATGTCA
 GAGTTGGCAGATTTGATACTTAATGAATGGTTGTGTAATCCTATGGATATTACATT
 ATATTATTATCAACAACTGATGAGGCGAATAAATGGATTTCAATGGGATCATCT
 TGTACTATAAAAGTATGTCCATTAAATACGCAAACATTGGGAATTGGGTGCCTAA
 CTACTGACACAAATACATTTGAAGAGATTGCAACGGCTGAAAACTAGCGATCA
 CTGATGTTGTGGATGGAGTCAATCACAACTGAGTGTTACAACGGATACTTGTAC
 GATTAAAAATTGTAAAAAACTAGGACCAAGAGAGAACGTAGCAGTCATACAGGT
 AGGCGGTTTCAGATATACTAGACATAACAGCTGATCCAACAACAGCACCACAAAC
 AGAAAGAATGATGCGAGTGAAGTGAAGAAATGGTGGCAAGTTTTTTACACAAT
 AGTTGATTACGTAAATCAAATCGTGCAAACAATGTCCAAGAGATCTAG

> PGRV10/ IBIÚNA

ATGTATGGTATTGAATATACCACAGTTTTAATCTTTTTGATATCAGTTATACTATT
 GAACAAAATACTTAAATCATTAAGTAAATAATGGACTTAATTATTAACAGGTAT
 CTATTAATTGTAGTCATACTGTCACCATTTATTGATGCACAAAATTACGGAATAA
 ATCTTCCGATTACTGGATCCATGGATGCCTCATATGCAAATTCAACGCAAGATGA
 AATATTCTTAACATCAACTTTATGTTTGTATTACCCAAGTGAAGCAGCAACACAA
 ATAAATGATAATTCGTGGAAAGATACACTTTCTCAATTATTTTTAACTAAAGGAT
 GGCCAACAGGATCCGTCTATTTTTAAAGATTACGCAGATATTGCCTCGTTTTTCAGTC
 GACCCTCAATTATACTGTGATTACAATCTAGTGTTAATGAAATATGATGCTACATT
 ACAATTAGATATGTCAGAACTAGCAGATTTGATACTTAATGAATGGTTATGTAAT
 CCTATGGATATTACATTATATTATTATCAACAACTGATGAGGCAAATAAATGGA
 TTTCAATGGGATCATCTTGTACTATAAAAGTATGTCCACTAAATACACAAACATT

AGGGATTGGTTGCCTAACTACTGACACAAATACATTTGAAGAAGTTGCAACAGCT
GAAAAGCTAGTGATCACTGACGTTGTAGATGGAGTCAATCATAAACTGAGCGTTA
CAACAAATACTTGTACGATTAGAAATTGTAAAAAACTAGGACCAAGAGAAAACG
TAGCAGTCATACAAGTAGGCGGGTCAGATATATTAGATATAACAGCTGATCCAAC
AACAGCACCAACAGAAAGAATGATGCGAGTGAATTGGGAAAAGTGGTGGCA
AGTTTTTTTATACAATA

>PGRV11/ IBIÚNA

ATAATTTTATTGAACTACATATTAATACTACTAGTGCAATGGACTTTATAAT
TTATCGATTTCTTCTACTTATTGTTATTGTGTCACCATTTCGTTAAAGCACAAAATT
ATGGAATTAATTTACCAATCACTGGCTCCATGGACACAGCATACGCAAATTCGTC
ACAGCAAGAAACATTTTAACTTCAACGCTATGCTTATATTATCCTACTGAAGCAT
CAACTCAAATTGGAGACACGGAATGGAAAGATACTCTGTCCCAATTATTTTTGAC
TAAGGGGTGGCCAACCTGGATCAGTCTATTTTAAGGAATATACCAATATCGCTTCA
TTCTCAATTGACCCACAACCTTTATTGTGATTATAATGTTGTACTGATGAAGTATGA
TTCAACGTTAGAGTTAGATATGTCTGAATTGGCTGATTTGATTTTAAATGAATGGT
TATGTAACCCGATGGATGTAACATTATATTATTATCAACAGACAGATGAAGCGAA
TAAATGGATATCGATGGGACAGTCTTGTACCATAAAAGTATGCCCATTTGAATACA
CAGACTTTAGGAATAGGTTGTACCACTACAAATGCAGCGACATTTGAAGAAGTAG
CTACAAGTGAAAAATTAGTAATAACCGATGTCGTTGATGGTGTGAATCATAAACT
TGATGTAACCTACAAATACCTGTACGATTAGAAATTGTAAGAAGTTAGGACCAAGA
GAAAATGTAGCAATTATCCAAGTTGGTGGCTCAGAAGTGTTAGATATTACGGCGG
ATCCAACCTACTACACCACAACTGAGCGTATGATGCGAGTAAATTGGAAAAAAT
GGTGGCAAGTTTTCTATACAGTAGTAGATTATATTAATCAGATTGTACAAGTTAT
GTCTAAAAGATCACGGTCATTAAATTCAGCGGCTTTTTACTATAGGGTCTGATAT
ATCTTAGATTAGAATTG

> PGRV12/ IBIÚNA

CTTCTTTTAATGTATGGTATTGAATATACCACAGTTTTAATCTTTTTGATATCAGTT
ATACTATTGAACTATATACTTAAATCATTAACTAGATAATGGACTTAATTATTTA
TAGATTTCTATTAATTGTAGTCATACTGTCACCATTTATTGATGCACAAAATTACG
GAATAAATCTTCCGATTACTGGATCCATGGATGCCTCATATGCAAATTCACGCA
AGATGAAATATTCTTAACATCAACTTTATGTTTGTATTACCCAACCTGAAGCAGCA
ACACAAATAAATGATAATTCGTGGAAAGATACACTTTCTCAATTATTTTTAACTA
AAGGATGGCCAACAGGATCCGTCTATTTTAAAGATTACGCAGATATTGCCTCGTT
TTCAGTCGACCCTCAATTATACTGTGATTACAATCTAGTGTTAATGAAATATGATG
CTACATTACAATTAGATATGTCAGAACTAGCAGATTTGATACTTAATGAATGGTT
ATGTAATCCTATGGATATTACATTATATTATTATCAACAACTGATGAGGCAAAT
AAATGGATTTCAATGGGATCATCTTGTACTATAAAAGTATGTCCACTAAATACAC
AAACATTAGGGATTGGTTGCCTAACTACTGACACAAATACATTTGAAGAAGTTGC
AACAGCTGAAAAGCTAGTGATCACTGACGTTGTAGATGGAGTCAATCATAAACTG
AGCGTTACAACAAATACTTGTACGATTAGAAATTGTAAAAAACTAGGACCAAGA
GAAAACGTAGCAGTCATACAAGTAGGCGGGTCAGATATATTAGATATAACAGCT
GATCCAACAACAGCACCAACAGAAAGAATGATGCGAGTGAATTGGAAGAAG
TGGTGGCAAGTTTTTTATACAATAGTTGATTACGTAAACCAAATTGTGCAAACAA
TGTCAAAAGATCCAGATCGTTAACTCTGCTGCATTTTACTACAGAGTG

> PGRV13/ PIEDADE

CGCTTGATTTTATCAATTACATATTAATACTAGTGACTAGAACAAATGGACTTTATT
ATTTACAGATTTCTACTAATTATGGTTTTACTTGCACCAATTATCAAGGCTCAAAA

TTATGGAATCAATTTACCAATAACTGGATCTATGGACAAACCATATGTGAACTCA
 ACGATGAGTGAAACGTTTTTAACTTCCACATTATGTTTGTATTACCCAAATGAAGC
 AGCTACTGAAATTGCGGATAACAAGTGGACGGAAACGTTATCACAACACTACTTCTA
 ACTAAAGGATGGCCGACAGGATCAGTATATTTCAAAGGATACGCTGATATCGCAT
 CGTTCTCTGTGGAACCACAATTATATTGCGATTACAATATAGTGTTAATGAAATAT
 GATGCAAATTTACAATTAGATATGTCTGAATTGGCTGATTTGATACTAAATGAAT
 GGTTGTGTAATCCAATGGATATAACACTCTATTATTATCAACAAACTGATGAAGC
 AAACAAGTGGATATCTATGGGTTCTTCATGTACAATTAAGTATGTCCTCTAAAT
 GCTCAGACTCTTGGAATAGGATGTTCTACTACGGATACTAATTCATTTCGAAATATT
 AGCTAACGCAGAGAAATTAGCTATAACTGATGTCGTTGATGGAGTTAATCATAAG
 TTAGATGTAACAACGAACACGTGTACTATAAGAAATTGTAAAAAACTTGGACCA
 AGAGAAAATGTCGCAGTGATTTCAGATAGGGGGTTCTAACGTACTTGACATAACA
 GCAGATCCAACACTACTGCACCACAACTGAAAGAATGATGCGTATAAATTGGAAA
 AGGTGGTGGCAAGTTTTATACAA

> PGRV14/ ITAPEVA

TTTTTTTGATATCGCTTGTATTTGTCAATTATATACTGAAATCAATTACCAGAACA
 ATGGACTATATCGTTTATAGGTCCTTATTGGTTATAGTCGTAAGTGCACCACTTAT
 TAAAACTCAAAATTACGGAATTAATTTACCAATAACTGGATCTATGGATACGCCA
 TATATAAATTCCACTACAAGTGAACTTTCTTGACTTCGACATTATGCATATATTA
 TCCAAATGAAGCAGCCACAGAAATTGCAGATACAAAATGGACAGAAACATTGTC
 ACAGTTATTTCTAACAAAAGGGTGGCCAACAGGATCGGTTTATTTCAAAGGATAT
 GCAGATATCGCGTCATTTTCTGTAGAACCACAGTTATACTGCGACTATAATGTTGT
 GATAATGAAGTATGATGTAAATTTACAGCTGGACACGTCTGAGTTGGCTGATTTA
 GTGTTGAATGAATGGCTATGTAATCCAATGGATATAACGCTATATTATTATCAGC
 AAACAGATGAAGCTAACAAATGGATATCAATGGGCACATCATGTACGATTAAAG
 TATGTCCATTAAATACACAACTCTAGGAATAGGGTGCTCGACTACAGACTTAA
 TTCATTTGAAACAGGGG

> PGRV15/ ITAPEVA

ATGTATGGTATTGAATATAACCACAGTTCTAACTTTTTTGATATCGCTTGTATTTGT
 CAATTATATACTGAAATCAATTACCAGAACAATGGACTATATCGTTTATAGGTCC
 TTATTGGTTATAGTCGTAAGTGCACCACTTATTA AAACTCAAAATTACGGAATTAA
 TTTACCAATAACTGGATCTATGGATACGCCATATATAAATTCCACTACAAGTGAA
 ACTTTCTTGACTTCGACATTATGCATATATTATCCAAATGAAGCAGCCACAGAAA
 TTGCAGATACAAAATGGACAGAAACATTGTCACAGTTATTTCTAACAAAAGGGTG
 GCCAACAGGATCGGTTTATTTCAAAGGATATGCAGATATAGCGTCATTTTCTGTA
 GAACCACAGTTATACTGCGACTATAATGTTGTGATAATGAAGTATGATGTAAATT
 TACAGCTGGATATGTCTGAGTTGGCTGATTTAGTGTTGAATGAATGGCTATGTAA
 TCCAATGGATATAACGCTATATTATTATCAGCAAACAGATGAAGCTAACAAATGG
 ATATCAATGGGCACATCATGTACGATTAAAGTATGTCCATTAAATACACAGACTC
 TAGGAATAGGGTGCTCGACTACAGACTTAAATTCATTTGAAACAGTGGCTAGTGC
 AGAGAAATTAGCTATAACTGATGTTGTTCGATGGAG

> PGRV16/ ITAPEVA

ATGTATGGTATTGAATATAACCACAGTTCTAACTTTTTTGATATCGCTTGTATTTGT
 CAATTATATACTGAAATCAATTACCAGAACAATGGACTATATCGTTTATAGGTCC
 TTATTGGTTATAGTCGTAAGTGCACCACTTATTA AAACTCAAAATTACGGAATTAA
 TTTACCAATAACTGGATCTATGGATACGCCATATATAAATTCCACTACAAGTGAA
 ACTTTCTTGACTTCGACATTATGCATATATTATCCAAATGAAGCAGCCACAGAAA

TTGCAGATACAAAATGGACAGAAACATTGTCACAGTTATTTCTAACAAAAGGGTG
 GCCAACAGGATCGGTTTATTTCAAAGGATATGCAGATATCGCGTCATTTTCTGTA
 GAACCACAGTTATACTGCGACTATAATGTTGTGATAATGAAGTATGATGTAAATT
 TACAGCTGGATATGTCTGAGTTGGCTGATTTAGTGTGAATGAATGGCTATGTAA
 TCCAATGGATATAACGCTATATTATTATCAGCAAACAGATGAAGCTAACAAATGG
 ATATCAATGGGCACATCATGTACGATTAAAGTATGTCCATTAAATACACAGACTC
 TAGGAATAGGGTGCTCGACTACAGACTTAAATTCATTTGAAACAGTGGCTAGTGC
 AGAGAAATTAGCTATAACTGATGTTGTGCGATGGAGTCAATCACAAGTTAGACGTA
 ACAACGAGTACATGTACTATAAGAAATTGTAAAAAACTTGGACCAAGAGAAAAT
 GTTGCTGTAATTCAGGTAGGAGGTCCAAACATACTCGACATAACAGCTGATCCAA
 CAACTGCACCACAGACAGAAAGAATGATGCGCATAAATTGGAAAAGATGGTGGC
 AAGT

> PGRV17/ ITAPEVA

TCGATTGTACCTGTCAATTATATACTGAAATCAATTACCAGAACAATGGACTATA
 TCGTTTATAGGTCCTTATTGGTTATAGTCGTAATTGCACCACTTATTAAACTCAA
 AATTACGGAATTAATTTACCAATAACTGGATCTATGGATACGCCATATATAAATT
 CCACTACAAGTGAACTTTCTTGACTTCGACATTATGCATATATTATCCAAATGAA
 GCAGCCACAGAAATTGCAGATACAAAATGGACAGAAACATTGTCACAGTTATTTT
 TAACAAAAGGGTGGCCAACAGGATCGGTTTATTTCAAAGGATATGCAGATATCGC
 GTCATTTTCTGTAGAACCACAGTTATACTGCGACTATAATGTTGTGATAATGAAGT
 ATGATGTAAATTTACAGCTGGATATGTCTGAGTTGGCTGATTTAGTGTGAATGA
 ATGGCTATGTAATCCAATGGATATAACGCTATATTATTATCAGCAAACAGATGAA
 GCTAACAAATGGATATCAATGGGCACATCATGTACGATTAAAGTATGTCCATTAA
 ATACACAGACTCTAGGAATAGGGTGCTCGACTACAGACTTAAATTCATTTGAAAC
 AGTGGCTAGTGCAGAGAAATTAGCTATAACTGATGTTGTGCGATGGAGTCAATCAC
 AAGTTAGACGTAACAACGAGTACATGTACTATAAGAAATTGTAAAAAACTTGG
 CCAAGAGAAAATGTTGCTGTAATTCAGGTAGGAGGTCCAAACATACTCGACATA
 ACAGCTGATCCAACAACGCTGCACCACAGACAGAAAGAATGATGCGCCTAAATTGG
 AAAAGATGGGTGGCAAGTCTTTTATACTAGTTGATTATGTCAATCAAATTGTGC
 AAGTCATGTCCAAACGATCACGCTCCTTAAATTCCCCTGCCTTTTATT

> PGRV18/ ITAPEVA

ATGTATGGTATTGAATATAACCACAGTTCTAACTTTTTTGATATCGCTTGTATTTGT
 CAATTATATACTGAAATCAATTACCAGAACAATGGACTATATCGTTTATAGGTCC
 TTATTGGTTATAGTCGTAATTGCACCACTTATTAAACTCAAATTACGGAATTAA
 TTTACCAATAACTGGATCTATGGATACGCCATATATAAATTCCACTACAAGTGAA
 ACTTTCTTGACTTCGACATTATGCATATATTATCCAAATGAAGCAGCCACAGAAA
 TTGCAGATACAAAATGGACAGAAACATTGTCACAGTTATTTCTAACAAAAGGGTG
 GCCAACAGGATCGGTTTATTTCAAAGGATATGCAGATATCGCGTCATTTTCTGTA
 GAACCACAGTTATACTGCGACTATAATGTTGTGATAATGAAGTATGATGTAAATT
 TACAGCTGGATATGTCTGAGTTGGCTGATTTAGTGTGAATGAATGGCTATGTAA
 TCCAATGGATATAACGCTATATTATTATCAGCAAACAGATGAAGCTAACAAATGG
 ATATCAATGGGCACATCATGTACGATTAAAGTATGTCCATTAAATACACAGACTC
 TAGGAATAGGGTGCTCGACTACAGACTTAAATTCATTTGAAACAGTGGCTAGTGC
 AGAGAAATTAGCTATAACTGATGTTGTGCGATGGAGTCAATCACAAGTTAGACGTA
 ACAACGAGTACATGTACTATAAGAAATTGTAAAAAACTTGGACCAAGAGAAAAT
 GTTGCTGTAATTCAGGTAGGAGGTCCAAACATACTCGACATAACAGCTGATCCAA
 CAACTGCACCACAGACAGAAAGAATGATGCGCATAAATTGGAAAAGATGGTGGC

AAGTCTTTTATACAATAGTTGACTATGTCAATCAAATGGTGCAAGTCATGTCCAA
ACGATCACGCTCCTTAGATTCCGCTGCCTTT

> PGRV19/ BOITUVA

TATACCACAGTTTTAACCTTTTTGATATCGGTTATATTATTGAATTATATACTCAA
ATCATTAACCAGAATAATGGACTTCATTATCTACAGATTTCTATTAATTGTAATCA
TATTGTCACCATTCTTAATGCACAAAATTACGGAATAAATCTTCCAATTACTGGA
TCAATGGATACTCCATATGCAAACCTCAACGCAAGAGGAAACATTTTTAACATCAA
CTTTATGCTTGTATTATCCAACCTGAAGCAGCAAGAGAAATAAATGATAATTCGTG
GAAAGATACACTTTCTCAATTATTTTTAACTAAAGGATGGCCGACAGGATCTGTA
TATTTTAAAGATTACGCAGATATTGCCTCGTTTTTCAGTCGATCCTCAATTATACTG
CGATTACAATCTAGTGATAATGAAATATGACGATACACTGCAACTAGATATGTCA
GAGTTAGCAGATTTGATACTTAATGAATGGTTATGCAATCCTATGGATATTACATT
ATATTATTACCAACAACTGATGAGGCGAATAAATGGATTTCAATGGGGTTCATCT
TGTACTATAAAGGTATGTCCACTAAATACGCAAACTAGGAATTGGGTGCCTAA
CTACTGATACAAATACATTTGAAGAGATTGCAACGGCTGAAAACTAGCGATCAC
TGATGTTGTGGATGGAGTCAATCATAAACTGAGTGTTACAACGAATACTTGTACG
ATTAGAAATTGTAAAAAACTAGGACCAAGAGAGAACGTAGCAGTCATACAGGTA
GGCGGTTTCAGATATACTAGACATAACGGCTGACCCAACAACAGCACCACAAACA
GAAAG

> PGRV20/ BOITUVA

TATACCACAGTTTTAACCTTTTTGATATCGGTTATATTATTGAATTATATACTCAA
ATCATTAACCAGAATAATGGACTTCATTATCTACAGATTTCTATTAATTGTAATCA
TATTGTCACCATTCTTAATGCACAAAATTACGGAATAAATCTTCCAATTACTGGA
TCAATGGATACTCCATATGCAAACCTCAACGCAAGAGGAAACATTTTTAACATCAA
CTTTATGCTTGTATTATCCAACCTGAAGCAGCAAGAGAAATAAATGATAATTCGTG
GAAAGATACACTTTCTCAATTATTTTTAACTAAAGGATGGCCGACAGGATCTGTA
TATTTTAAAGATTACGCAGATATTGCCTCGTTTTTCAGTCGATCCTCAATTATACTG
CGATTACAATCTAGTGATAATGAAATATGACGATACACTGCAACTAGATATGTCA
GAGTTAGCAGATTTGATACTTAATGAATGGTTATGCAATCCTATGGATATTACATT
ATATTATTACCAACAACTGATGAGGCGAATAAATGGATTTCAATGGGGTTCATCT
TGTACTATAAAGGTATGTCCACTAAATACGCAAACTAGGAATTGGGTGCCTAA
CTACTGATACAAATACATTTGAAGAGATTGCAACGGCTGAAAACTAGCGATCAC
TGATGTTGTGGATGGAGTCAATCATAAACTGAGTGTTACAACGAATACTTGTACG
ATTAGAAATTGTAAAAAACTAGGACCAAGAGAGAACGTAGCAGTCATACAGGTA
GGCGGTTTCAGATATACTAGACATAACGGCTGACCCAACAACAGCACC

> PGRV21/ BOITUVA

ATGTATGGTATTGAATATACCACAGTTCTAACCTTTCTGATATCAATAATTTTATT
GAACTATATATTTAAATCATTAAGTAGTGCAATGGACTTTATAATTTATCGATTTT
TTCTACTTATTGTTATTGTGTCAACATTCGTTAAAGCACAAAATTATGGAATTAAT
TTACCAATCACTGGCTCCATGGACACAGCATAACGCAAATTCGTCACAGCAAGAAA
CATTTTTAACTTCAACGCTATGCTTATATTATCCTACTGAAGCATCAACTCAAATT
GGAGACACGGAATGGAAAGATACTCTGTCTCAATTATTTTTGACCAAGGGGTGGC
CAACTGGATCAGTCTACTTTAAAGAATATACCGATATCGCTTCATTCTCAATTGAT
CCACAACCTTACTGTGACTATAATGTTGTACTGATGAAGTATGATTCAACATTAG
AGTTGGATATGTCTGAATTAGCTGATTTGATTCTAAATGAATGGTTATGTAATCCG
ATGGATATAACATTATATTATTATCAGCAAACAGATGAATCGAATAAATGGATAT
CGATGGGACAGTCTTGTACTATAAAAGTATGTCCATTGAATACACAACTTTAGG

AATAGGTTGTACTACTACAAATAAAGCGACATTTGAAGAAGTGGCTACAAGTGA
 AAAATTAGTAATAACTGATGTCGTTGATGGTGTGAATCATAAACTTGATGTAACC
 ACAAATACCTGTACGATTAGAAAATTGTAAAAAATTAGGACCAAGAGAAAATGTG
 GCAATTATACAAGTCGGTGGCTCAGAAAGTGTTAGATATTACGGCGGATCCAAC
 CTACACC

>PIGSP1/ ITAPEVA

CCTCTTTTTATGTATGGTATTGAATATACCACAGTTCTAACTTTTTTGATATCGCTT
 GTATTTGTCAATTATATACTGAAATCAATTACCAGAACAATGGACTATATCGTTTA
 TAGGTCCTTATTGGTTATAGTCGTAATTGCACCACTTATTA AAACTCAA AATTACG
 GAATTAATTTACCAATAACTGGATCTATGGATACGCCATATATAAATTCCTACTAC
 AAGTGAACTTTCTTGACTTCGACATTATGCATATATTATCCAAATGAAGCAGCC
 ACAGAAATTGCAGATACAAAATGGACAGAAACATTGTCACAGTTATTTCTAACAA
 AAGGGTGGCCAACAGGATCGGTTTATTTCAAAGGATATGCAGATATCGCGTCATT
 TTCTGTAGAACCACAGTTATACTGCGACTATAATGTTGTGATAATGAAGTATGAT
 GTAAATTTACAGCTGGATATGTCTGAGTTGGCTGATTTAGTGTTGAATGAATGGC
 TATGTAATCCAATGGATATAACGCTTTATTATTATCAGCAAACAGATGAAGCTAA
 CAATTGGATATCAATGGGCACATCATGTACGATTAAAGTTTGTCCATTAATTACA
 CAGACCCTAGAAAGGGGG

>PIGSP2/ ITAPEVA

TATACCACAGTTCTAACTTTTTTGATATCGCTTGTATTTGTCAATTATATACTGAA
 ATCAATTACCAGAACAATGGACTATATCGTTTATAGGTCCTTATTGGTTATAGTCG
 TACTTGCACCACTTATTA AAACTCAA AATTACGGAATTAATTTACCAATAACTGG
 ATCTATGGATACGCCATATATAAATTCCTACTACAAGTGAACTTTCTTGACTTCGA
 CATTATGCATATATTATCCAAATGAAGCAGCCACAGAAATTGCAGATACAAAATG
 GACAGAAACATTGTCACAGTTATTTCTAACAAAAGGGTGGCCAACAGGATCGGTT
 TATTTCAAAGGATATGCAGATATCGCGTCATTTTCTGTAGAACCACAGTTATACTG
 CGACTATAATGTTGTGATAATGAAGTATGATGTAAATTTACAGCTGGATATGTCT
 GAGTTGGCTGATTTAGTGTTGAATGAATGGCTATGTAATCCAATGGATATAACGC
 TATATTATTATCAGCAAACAGATGAAGCTAACAAATGGATATCAATGGGCACATC
 ATGTACGATTAAAGTATGTCCATTAAATACACAGACTCTAGGAATAGGGTGCTCG
 ACTACAGACTTAAATTCATTTGAAACAGTGGCTAGTGCAGAGAAATTAGCTATAA
 CTGATGTTGTGATGGAGTCAATCACAAGTTAGACGTAACAACGAGTACATGTAC
 TATAAGAAATTGTAAAAA ACTTGGACCAAGAGAAAATGTTGCTGTAATTCAG

>PIGSP3/ ITAPEVA

ATGTATGGTATTGAATATACCACAGTTCTAACTTTTTTGATATCGCTTGTATTTGT
 CAATTATATACTGAAATCAATTACCAGAACAATGGACTATATCGTTTATAGGTCC
 TTATTGGTTATAGTCGTAATTGCACCACTTATTA AAACTCAA AATTACGGAATTA
 TTTACCAATAACTGGATCTATGGATACGCCATATATAAATTCCTACTACAAGTGAA
 ACTTTCTTGACTTCGACATTATGCATATATTATCCAAATGAAGCAGCCACAGAAA
 TTGCAGATACAAAATGGACAGAAACATTGTCACAGTTATTTCTAACAAAAGGGTG
 GCCAACAGGATCGGTTTATTTCAAAGGATATGCAGATATCGCGTCATTTTCTGTA
 GAACCACAGTTATACTGCGACTATAATGTTGTGATAATGAAGTATGATGTAAATT
 TACAGCTGGATATGTCTGAGTTGGCTGATTTAGTGTTGAATGAATGGCTATGTAA
 TCCAATGGATATAACGCTATATTATTATCAGCAAACAGATGAAGCTAACAAATGG
 ATATCAATGGGCACATCATGTACGATTAAAGTATGTCCATTAAATACACAGACTC
 TAGGAATAGGGTGCTCGACTACAGACTTAAATTCATTTGAAACAGTGGCTAGTGC
 AGAGAAATTAGCTATAACTGATGTTGTGATGGAGTCAATCACAAGTTGGACGTA

ACAACGAGTACATGTACTATAAGAAATTGTAAAAAACTTGGACCAAGAGAAAAT
GTTGCTGTAATTCAGGTAGGAGGTCCAAACATACTCGACATAACAGCT

Anexo B

Sequências nucleotídicas do gene codificador da VP4 dos rotavírus geradas neste estudo (números de acesso *Genbank* serão disponibilizados publicamente após processamento):

>PGRV1/ ITÚ

AGAATTGGGTCATCAAGATCACAGGATGTAACAATAAATCCAGGACCATTTGCTC
AAACTGGATACGCTCCAGTAAATTGGGGCCCAGGTGAGACGAACGATTCAACAA
CAATTGAACCAGTGTTAGACGGACCATATCAACCAACGACTTTTAATCCACCGAT
AGAATATTGGACGTTATTCGCTCCCAATGACAAGGGTGTAGTTGCTGAATTGACA
ACAATACAGATATATGGTTAGTCATTATCCTAATTGAACCAAATGCATCTCGAG
AACTCAGAACGTACACTGTATTCGGTCAACAGGTAAACCTAACGGTAGAGAATAC
ATCACAACAAAATGGAAATTTGCTGATTTTGTAGTAGAAGAAGTCAAAATGATACT
TACGTGTCTAATGACACACTTTTATCAGATGTAAAACCTGCAGGCTGCAATGAAAT
ATGGAGCAAGGTTATTTACATTCCTGAGATACACCGAATGCAGCGCCACAGG
AATTTGGATATACAACCTAACAACCTACAGTGCCATTGAGATACGATCATTTTGTGA
TTTTTACATAATACCGCGCATACCACGAGAGGTGTGTAGAACTATATTAATCAC
GGTCTTCCACCAATGCAAAATACTAGAAATGTAGTATCAGTCGCATTATCAGCTA
GGGAAGCAGTAATACAAAAGTGAGTGTTAATGAAGACATCGTTATATCTAAAA
CTTCTTTATGGAAAGAAATGCAGTATA

> PGRV2/ ITÚ

ATGTAACAATAAATCCAGGACCATTTGCTCAAACCTGGATACGCTCCAGTAAATTG
GGGCCCAGGTGAGACGAACGATTCAACAACAATTGAACCAGTGTTAGACGGACC
ATATCAACCAACGACTTTTAATCCACCGATAGAATATTGGACGTTATTCGCTCCC
AATGACAAGGGTGTAGTTGCTGAATTGACAAACAATACAGATATATGGTTAGTCA
TTATCCTAATTGAACCAAATGCATCTCGAGAACTCAGAACGTACACTGTATTCGG
TCAACAGGTAAACCTAACGGTAGAGAATACATCACAACAAAATGGAAATTTGC
TGATTTTGTAGTAGAAGAAGTCAAAATGATACTTACGTGTCTAATGACACACTTTTA
TCAGATGTAAAACCTGCAGGCTGCAATGAAATATGGAGCAAGGTTATTTACATTCA
CTGGAGATACACCGAATGCAGCGCCACAGGAATTTGGATATACAACCTAACAAC
ACAGTGCCATTGAGATACGATCATTTTGTGATTTTACATAATACCGCGCATACCA
CGAGAGGtGTGTAGAACTATATTAATCACGGTCTTCCACCAATGCAAAATACTA
GAAATGTAGTATCAGTCGCATTATCAGCTAGGGAAGCAGTAATACAAAAGTG
GTGTTAATGAAGACATCGTTATATCTAAAACCTTCTTTATGGAAAGAAATGCAGTA
TAATAGAGATAT

> PGRV3/ ITÚ

ATTGAGAATTGGGTCATCAAGATCACAGGATGTAACAATAAATCCAGGACCATT
 GCTCAAACCTGGATACGCTCCAGTAAATTGGGGCCCAGGTGAGACGAACGATTCA
 ACAACAATTGAACCAGTGTTAGACGGACCATATCAACCAACGACTTTTAATCCAC
 CGATAGAATATTGGACGTTATTCGCTCCCAATGACAAGGGTGTAGTTGCTGAATT
 GACAAACAATACAGATATATGGTTAGTCATTATCCTAATTGAACCAAATGCATCT
 CGAGAACTCAGAACGTACACTGTATTCGGTCAACAGGTAAACCTAACGGTAGAG
 AATACATCACAAACAAAATGGAAATTTGCTGATTTTAGTAGAAGAAGTCAAAAT
 GATACTTACGTGTCTAATGACACACTTTTATCAGATGTAAAACTGCAGGCTGCAA
 TGAAATATGGAGCAAGGTTATTTACATTCACTGGAGATACACCGAATGCAGCGCC
 ACAGGAATTTGGATATACAATAACAATACTACAGTGCCATTGAGATACGATCATTT
 TGTGATTTTTACATAATACCGCGCATACCACGAGAGGTGTGTAGAACTATATTA
 ATCACGGTCTTCCACCAATGCAAAATACTAGAAATGTAGTATCAGTCGCATTATC
 AGCTAGGGAAGCAGTAATACAAAAAGTGAGTGTTAATGAAGACATCGTTATATC
 TAAAACTTCTTTATGGAAAGAAATGCAGTATAATAGAGATATTACAATTAGATTC
 A

> PGRV4/ ITÚ

TTGGGTCATCAAGATCACAGGATGTAACAATAAATCCAGGACCATTTGCTCAAAC
 TGGATACGCTCCAGTAAATTGGGGCCCAGGTGAGACGAACGATTCAACAACAAT
 TGAACCAGTGTTAGACGGACCATATCAACCAACGACTTTTAATCCACCGATAGAA
 TATTGGACGTTATTCGCTCCCAATGACAAGGGTGTAGTTGCTGAATTGACAAACA
 ATACAGATATATGGTTAGTCATTATCCTAATTGAACCAAATGCATCTCGAGAACT
 CAGAACGTACACTGTATTCGGTCAACAGGTAAACCTAACGGTAGAGAATACATCA
 CAAACAAAATGGAAATTTGCTGATTTTAGTAGAAGAAGTCAAAATGATACTTACG
 TGTCTAATGACACACTTTTATCAGATGTAAAACTGCAGGCTGCAATGAAATATGG
 AGCAAGGTTATTTACATTCACTGGAGATACACCGAATGCAGCGCCACAGGAATTT
 GGATATACAATAACAATACTACAGTGCCATTGAGATACGATCATTTTTGTGATTTTT
 ACATAATACCGCGCATACCACGAGAGGTGTGTAGAACTATATTAATCACGGTCT
 TCCACCAATGCAAAATACTAGAAATGTAGTATCAGTCGCATTATCAGCTAGGGAA
 GCAGTAATACAAAAAGTGAGTGTTAATGAAGACATCGTTATATCTAAAACTTCTT
 TATGGAAAGAAATGCAGTATAATAGAGATATACA

> PGRV5/ ITÚ

TTGGGTCATCAAGATCACAGGATGTAACAATAAATCCAGGACCATTTGCTCAAAC
 TGGATACGCTCCAGTAAATTGGGGCCCAGGTGAGACGAACGATTCAACAACAAT
 TGAACCAGTGTTAGACGGACCATATCAACCAACGACTTTTAATCCACCGATAGAA
 TATTGGACGTTATTCGCTCCCAATGACAAGGGTGTAGTTGCTGAATTGACAAACA
 ATACAGATATATGGTTAGTCATTATCCTAATTGAACCAAATGCATCTCGAGAACT
 CAGAACGTACACTGTATTCGGTCAACAGGTAAACCTAACGGTAGAGAATACATCA
 CAAACAAAATGGAAATTTGCTGATTTTAGTAGAAGAAGTCAAAATGATACTTACG
 TGTCTAATGACACACTTTTATCAGATGTAAAACTGCAGGCTGCAATGAAATATGG
 AGCAAGGTTATTTACATTCACTGGAGATACACCGAATGCAGCGCCACAGGAATTT
 GGATATACAATAACAATACTACAGTGCCATTGAGATACGATCATTTTTGTGATTTTT
 ACATAATACCGCGCATACCACGAGAGGTGTGTAGAACTATATTAATCACGGTCT
 TCCACCAATGCAAAATACTAGAAATGTAGTATCAGTCGCATTATCAGCTAGGGAA
 GCAGTAATACAAAAAGTGAGTGTTAATGAAGACATCGTTATATCTAAAACTTCTT
 TATGGAAAGAAATGCAGTATAATAGAGATATTACAATTAGATTCAAGTT

> PGRV6/ ITÚ

GAATTGGGTCATCAAGATCACAGGATGTAACAATAAATCCAGGACCATTTGCTCA
 AACTGGATACGCTCCAGTAAATTGGGGCCCAGGTGAGACGAACGATTCAACAAC
 AATTGAACCAGTGTTAGACGGACCATATCAACCAACGACTTTTAATCCACCGATA
 GAATATTGGACGTTATTCGCTCCCAATGACAAGGGTGTAGTTGCTGAATTGACAA
 ACAATACAGATATATGGTTAGTCATTATCCTAATTGAACCAAATGCATCTCGAGA
 ACTCAGAACGTACACTGTATTCGGTCAACAGGTAAACCTAACGGTAGAGAATACA
 TCACAAACAAAATGGAAATTTGCTGATTTTAGTAGAAGAAGTCAAAATGATACTT
 ACGTGTCTAATGACACACTTTTATCAGATGTAAAACTGCAGGCTGCAATGAAATA
 TGGAGCAAGGTTATTTACATTCACTGGAGATACACCGAATGCAGCGCCACAGGA
 ATTTGGATATACAACCTAACAACTACAGTGCCATTGAGATACGATCATTTTGTGAT
 TTTTACATAATACCGCGCATACCACGAGAGGTGTGTAGAACTATATTAATCACG
 GTCTTCCACCAATGCAAAATACTAGAAATGTAGTATCAGTCGCATTATCAGCTAG
 GGAAGCAGTAATACAAAAAGTGAGTGTTAATGAAGACATCGTTATATCTAAAAC
 TTCTTTATGGAAAGAAATGCAGTATAATAGAGATATTACAATTAGATCAAGT

> PGRV7/ ITÚ

TTGGGTCATCAAGATCACAGGATGTAACAATAAATCCAGGACCATTTGCTCAAAC
 TGGATACGCTCCAGTAAATTGGGGCCCAGGTGAGACGAACGATTCAACAACAAT
 TGAACCAGTGTTAGACGGACCATATCAACCAACGACTTTTAATCCACCGATAGAA
 TATTGGACGTTATTCGCTCCCAATGACAAGGGTGTAGTTGCTGAATTGACAAACA
 ATACAGATATATGGTTAGTCATTATCCTAATTGAACCAAATGCATCTCGAGAACT
 CAGAACGTACACTGTATTCGGTCAACAGGTAAACCTAACGGTAGAGAATACATCA
 CAAACAAAATGGAAATTTGCTGATTTTAGTAGAAGAAGTCAAAATGATACTTACG
 TGTCTAATGACACACTTTTATCAGATGTAAAACTGCAGGCTGCAATGAAATATGG
 AGCAAGGTTATTTACATTCACTGGAGATACACCGAATGCAGCGCCACAGGAATTT
 GGATATACAACCTAACAACTACAGTGCCATTGAGATACGATCATTTTGTGATTTT
 ACATAATACCGCGCATACCACGAGAGGTGTGTAGAACTATATTAATCACGGTCT
 TCCACCAATGCAAAATACTAGAAATGTAGTATCAGTCGCATTATCAGCTAGGGAA
 GCAGTAATACAAAAAGTGAGTGTTAATGAAGACATCGTTATATCTAAAACCTTCT
 TATGGAAAGAAATGCAGTATAATAGAGATAT

> PGRV8/ ITÚ

AATTGGGTCATCAAGATCACAGGATGTAACAATAAATCCAGGACCATTTGCTCAA
 ACTGGATACGCTCCAGTAAATTGGGGCCCAGGTGAGACGAACGATTCAACAACA
 ATTGAACCAGTGTTAGACGGACCATATCAACCAACGACTTTTAATCCACCGATAG
 AATATTGGACGTTATTCGCTCCCAATGACAAGGGTGTAGTTGCTGAATTGACAAA
 CAATACAGATATATGGTTAGTCATTATCCTAATTGAACCAAATGCATCTCGAGAA
 CTCAGAACGTACACTGTATTCGGTCAACAGGTAAACCTAACGGTAGAGAATACAT
 CACAAACAAAATGGAAATTTGCTGATTTTAGTAGAAGAAGTCAAAATGATACTTA
 CGTGTCTAATGACACACTTTTATCAGATGTAAAACTGCAGGCTGCAATGAAATAT
 GGAGCAAGGTTATTTACATTCACTGGAGATACACCGAATGCAGCGCCACAGGAA
 TTTGGATATACAACCTAACAACTACAGTGCCATTGAGATACGATCATTTTGTGATTT
 TTACATAATACCGCGCATACCACGAGAGGTGTGTAGAACTATATTAATCACGGT
 CTTCCACCAATGCAAAATACTAGAAATGTAGTATCAGTCGCATTATCAGCTAGGG
 AAGCAGTAATACAAAAAGTGAGTGTTAATGAAGACATCGTTATATCTAAAACCTC
 TTTATGGAAAGAAATGCAGTATAATAGAGATATTACAA

> PGRV9/ ITÚ

TTATCTGATGATTGAAGAAATTGGGTCATCAAGATCACAGGATGTAACAATAAAT
 CCAGGACCATTGCTCAAACCTGGATACGCTCCAGTAAATTGGGGCCCAGGTGAGA
 CGAACGATTCAACAACAATTGAACCAGTGTTAGACGGACCATATCAACCAACGA
 CTTTAAATCCACCGATAGAATATTGGACGTTATTCGCTCCCAATGACAAGGGTGT
 AGTTGCTGAATTGACAAACAATACAGATATATGGTTAGTCATTATCCTAATTGAA
 CCAAATGCATCTCGAGAACTCAGAACGTACACTGTATTCGGTCAACAGGTAAACC
 TAACGGTAGAGAATACATCACAAACAAAATGGAAATTTGCTGATTTTAGTAGAA
 GAAGTCAAAATGATACTTACGTGTCTAATGACACACTTTTATCAGATGTAAAACT
 GCAGGCTGCAATGAAATATGGAGCAAGGTTATTTACATTCACTGGAGATACACCG
 AATGCAGCGCCACAGGAATTTGGATATACAACTAACAACTACAGTGCCATTGAG
 ATACGATCATTTTGTGATTTTACATAATACCGCGCATACCACGAGAGGTGTGTA
 GAAACTATATTAATCACGGTCTTCCACCAATGCAAAATACTAGAAATGTAGTATC
 AGTCGCATTATCAGCTAGGGAAGCAGTAATACAAAAGTGAGTGTTAATGAAGA
 CATCGTTATATCTAAAACTTCTTTATGGAAAGAAATGCAGTATAATAGAGATATT
 ACATTAGATTCAGTTGCTAATCAA

> PGRV10/ IBIÚNA

ACTGATTTATCTGATGAGATTGAAGAAATTGGATCATCAAAATCTCAGGATGTTA
 CAGTAAATCCAGGACCATTGCTCAAACCTGGATATGCACCAGTAAATTGGGGATC
 TGGTGAAACAAATGATTCAACAACAGTAGAACCAGTTTTGGACGGGCCGTACCA
 ACCTACGACTTTTAAATCCGTCAATAGAGTATTGGACATTATTTGCTCCTAATAATA
 AAGGTGTGATAGCTGAAATGACAAATAATAATAGTATATGGCTGGCTACTGTTTT
 AATTGAACCAAATGTTTCTCAAGAACTAAGGACATACACAATATTTGGTCAACAA
 GTTGGGTTAGTGGTTGAAAATACTTCGCAACAAAGTGGAATTCATAGACTTTG
 GTAGAAACAGTCAAACCTGATAGCTATACAAATTATGGCACGCTTTTATCAGAAAC
 GAAATTACAGGCTGCGATGAAGTATGGAGGAAAATTATTCACATTTATTGGCGAC
 ACGCCAAATGCAGCACCATATGAATGGGGATATGTGACGAATAATTATGATATG
 ATTGTGATAACTTCATATTGTGATTTTACATAGTTCCACGTCTACCACGAGAAAT
 TTGTAGAAATTATATTAATCATGGACTTCCGCCTATGCAAAACACGAGGAATATA
 ATACCAGTTGCATTATCAGCTAGAGACATTGTAACACAAAGAGCAAGTGTTAATG
 AAGATATAGTTATATCAAAAACCTCTTTATGGAAAGAAATGCAATATAATAGGGA
 TATTGTA

> PGRV11/ IBIÚNA

TTACTGTCTCCATCTAATGCAGGAGTAGTAGTGGAAGGAACAAACAATTCAGATA
 GGTGGTTAGCCACTATACTAATTGAACCGAATGTAATATCACAAACCAGGACATA
 TACTTTATTTGGACAACAAGAACAGATAACAGTTGAAAATGTTTCAACGACGAAA
 TGGAAGTTTGTAGATTTGGCTAAAACCTGATATCAATGGAACATATACGCAGCATG
 GACCATTACTTTCAGATACAAAACCTGTATGGAGTGATGAAATTTAGTGGCAGACT
 ATATACCTACAATGGTGCAACACCGAATGCAACTACTGGTTATTACACCACAACCT
 AATTATGACATGGTAAATATGGTATCACACTGTGACTTTTACATCATAACCACGAT
 CTGAAGAAAGCACATGCACAAATTATATTAATAATGGATTACCACCAATACAGA
 ATACTAGGAATGTGGTTCCAGTGTCTCTAACTTCTAGATCAATTGTACACACTAG
 AGCTCAGGCGAACGAAGACATTATTGTATCAAAAACCTTCGTTATGGAAAGAAAT
 GCAGTATAATAGAGATATAACTATACGTTTTAAATTTGCGAACGCTATAATT

> PGRV12/ IBIÚNA

ACAAATGATTCAACAACAGTAGAACCAGTTTTGGACGGGCCGTACCAACCTACG
 ACTTTTAAATCCGTCAATAGAGTATTGGACATTATTTGCTCCTAATAATAAAGGTGT

GATAGCTGAAATGACAAATAATAATAGTATATGGCTGGCTACTGTTTTAATTGAA
 CCAAATGTTTCTCAAGAACTAAGGACATACACAATATTTGGTCAACAAGTTGGGT
 TAGTGGTTGAAAATACTTCGCAAACAAAGTGGAAATTCATAGACTTTGGTAGAAA
 CAGTCAAACCTGATAGCTATACAAATTATGGCACGCTTTTATCAGAAACGAAATTA
 CAGGCTGCGATGAAGTATGGAGGAAAATTATTCACATTTATTGGCGACACGCCAA
 ATGCAGCACCATATGAATGGGGATATGTGACGAATAATTATGATATGATTGTGAT
 AACTTCATATTGTGATTTTTACATAGTTCCACGTCTACCACGAGAAATTTGTAGAA
 ATTATATTAATCATGGACTTCCGCCTATGCAAAACACGAGGAATATAATACCAGT
 TGCATTATCAGCTAGAGACATTGTAACACAAAGAGCAAGTGTTAATGAAGATATA
 GTTATATCAAAAACCTTCTTTATGGAAAGAAATGCAATATAATAGGGATATTGTAA
 TTAGATTTAAA

> PGRV13/ PIEDADE

AGACAGCTACTATCAAATTCATATACTGTAGATCTATCAGATGAGATACAAACTA
 TCGGTTCTGAAAAACGCAAAGTGTAACAATAAATCCTGGACCATTTCGCACAGAC
 TGGATATGCCCCAGTAAACTGGGGACCTGGAGAAACCAATGATTCAACAACAGT
 TGAACCAGTACTTGATGGTCCGTATCAGCCTACTACATTTAATCCACCAGTAAGTT
 ATTGGATATTATTGTCGCCATCTAATGCGGGCGTAGTGGTAGAAGGGACGAATAA
 TTTAGACAGATGGCTAGCTACCATACTAATTGAGCCAAATGTCACATCACAAAGT
 AGGACATATACATTATTTGGACAACAAGAACAATAACAGTTGAAAATACTTCA
 ACAACGAAGTGGAATTTATAGATTTAGCTAAATCTGATGTTAATGGAACATTTA
 CACAACATGGACCATTATTGTCATCTACAAAACCTATATGGAGTAATGAAATTTAG
 TGGTAAATTATATACATATAATGGTGAGACACCAAATGCTACTACAGGTTATTAC
 ACTACAACATAATTATGATACGGTTAATATGGTATCACACTGCGACTTTTATATCAT
 ACCAAGATCCGAGGAAAGTGCATGCACAAATTACATCAATAATGGATTACCACC
 AATGCAAAATACTAGAAATGTAGTTCCAGTATCTTTAACATCTAGGTCAATTGTT
 CATACTAGAGCACAAAGCGAATGAAGATATTGTTATATCGAAAGCATCATTATGGA
 AGGAAATGCAGTACAATAGAGATATAACTATA

> PGRV14/ ITAPEVA

ATATTGTTGTCGCCATCTAGTGCGGGCGTAGTAGTAGAAGGGACGAATAATCTAG
 ACAGATGGCTAGCTACCATACTAATTGAGCCAAATGTCACATCACAAAGTAGAAT
 ATATACATTATTTGGACAACAAGAACGAATAACAGTTGAAAACGCTTCAGCAAC
 GAAGTGGAATTCATAGATTTAGCTAAAACCTGATGTTAATGGAACATTCACACAA
 CATGGGGCCATTATTGTCAGCTACAAAACCTATATGGAGTAATGAAATTTAGTGGTA
 GATTATATACATATAATGGTGAGACACCAAATGCTACTACAGGTTATTACACTAC
 AACTAATTATGATACGGTTAATATGGTATCACACTGCGACTTTTATATCATACCAA
 GATCCGAGGAAAGCACATGCACAAATTACATAAATAATGGATTACCACCAATAC
 AAAATACTAGAAATGTAGTACCAGTATCTTTAACATCTAGGTCAATTGTTTCATAC
 TAGAGCACAAAGCGAATGAAGACATTGTTATATCGAAAACATCATTATGGAAAGA
 AATGCAGTACAACAGAGATATAACTATA

> PGRV15/ ITAPEVA

ACTAATGATTCAACAACGGTTGAACCAGTACTTGATGGTCCGTATCAGCCTACTA
 CATTTAATCCACCAGTAAGTTATTGGATATTGTTGTCGCCATCTAGTGCGGGCGTA
 GTAGTAGAAGGGACGAATAATCTAGACAGATGGCTAGCTACCATACTAATTGAG
 CCAAATGTCACATCACAAAGTAGAATATATACATTATTTGGACAACAAGAACGA
 ATAACAGTTGAAAACGCTTCAGCAACGAAGTGGAAATTCATAGATTTAGCTAAA
 ACTGATGTTAATGGAACATTCACACAACATGGGGCCATTATTGTCAGCTACAAAAC

TATATGGAGTAATGAAATTTAGTGGTAGATTATATACATATAATGGTGAGACACC
 AAATGCTACTACAGGTTATTACACTACAACATAATTATGATACGGTTAATATGGTA
 TCACACTGCGACTTTTATATCATACCAAGATCCGAGGAAAGCACATGCACAAATT
 ACATAAAATAATGGATTACCACCAATACAAAATACTAGAAATGTAGTACCAGTATC
 TTTAACATCTAGGTCAATTGTTTCATACTAGAGCACAAGCGAATGAAGACATTGTT
 ATATCGAAAACATCATTATGGAAAGAAATGCAGTACAACAGAGATATAACTATA
 CGTTTTAAATTTGCAAATGCCATAATTAATCTGGTGGG

> PGRV16/ ITAPEVA

GCACAAACTGGATACGCCCCGGTAAACTGGGGACCTGGAGAACTAATGATTCA
 ACAACGGTTGAACCAGTACTTGATGGTCCGTATCAGCCTACTACATTTAATCCAC
 CAGTAAGTTATTGGATATTGTTGTGCGCCATCTAGTGCGGGCGTAGTAGTAGAAGG
 GACGAATAATCTAGACAGATGGCTAGCTACCATACTAATTGAGCCAAATGTCACA
 TCACAAAGTAGAATATATACATTATTTGGACAACAAGAACGAATAACAGTTGAA
 AACGCTTCAGCAACGAAGTGGAATTCATAGATTTAGCTAAAACCTGATGTTAATG
 GAACATTCACACAACATGGGCCATTATTGTCAGCTACAAAACCTATATGGAGTAAT
 GAAATTTAGTGGTAGATTATATACATATAATGGTGAGACACCAAATGCTACTACA
 GGTTATTACACTACAACATAATTATGATACGGTTAATATGGTATCACACTGCGACTT
 TTATATCATACCAAGATCCGAGGAAAGCACATGCACAAATTACATAAAATAATGG
 ATTACCACCAATACAAAATACTAGAAATGTAGTACCAGTATCTTTAACATCTAGG
 TCAATTGTTTCATACTAGAGCACAAGCGAATGAAGACATTGTTATATCGAAAACAT
 CATTATGGAAAGAAATGCAGTACAACAGAGATATAACTATACGTTTTAAATTTGC
 AAATGCC

> PGRV17/ITAPEVA

TCGCTCATTTATAGACAGCTACTGTCAAATTCATATACTGTAGATTTATCAGATGA
 GATACAAACTATCGGTTCTGAGAAAACGCAAAACGTAACAATAAATCCTGGACC
 ATTCGCACAAACTGGATACGCCCCGGTAAACTGGGGACCTGGAGAACTAATGA
 TTCAACAACGGTTGAACCAGTACTTGATGGTCCGTATCAGCCTACTACATTTAATC
 CACCAGTAAGTTATTGGATATTGTTGTGCGCCATCTAGTGCGGGCGTAGTAGTAGA
 AGGGACGAATAATCTAGACAGATGGCTAGCTACCATACTAATTGAGCCAAATGTC
 ACATCACAAAGTAGAATATATACATTATTTGGACAACAAGAACGAATAACAGTT
 GAAAACGCTTCAGCAACGAAGTGGAATTCATAGATTTAGCTAAAACCTGATGTTA
 ATGGAACATTCACACAACATGGGCCATTATTGTCAGCTACAAAACCTATATGGAGT
 AATGAAATTTAGTGGTAGATTATATACATATAATGGTGAGACACCAAATGCTACT
 ACAGGTTATTACACTACAACATAATTATGATACGGTTAATATGGTATCACACTGCG
 ACTTTTATATCATACCAAGATCCGAGGAAAGCACATGCACAAATTACATAAAATAA
 TGGATTACCACCAATACAAAATACTAGAAATGTAGTACCAGTATCTTTAACATCT
 AGGTCAATTGTTTCATACTAGAGCACAAGCGAATGAAGACATTGTT

> PGRV18/ ITAPEVA

GATTCAACAACGGTTGAACCAGTACTTGATGGTCCGTATCAGCCTACTACATTTA
 ATCCACCAGTAAGTTATTGGATATTGTTGTGCGCCATCTAGTGCGGGCGTAGTAGT
 AGAAGGGACGAATAATCTAGACAGATGGCTAGCTACCATACTAATTGAGCCAAA
 TGTCACATCACAAAGTAGAATATATACATTATTTGGACAACAAGAACGAATAACA
 GTTGAACGCTTCAGCAACGAAGTGGAATTCATAGATTTAGCTAAAACCTGATG
 TTAATGGAACATTCACGCAACATGGGCCATTATTGTCAGCTACAAAACCTATATGG
 AGTAATGAAATTTAGTGGTAGATTATATACATATAATGGTGAGACACCAAATGCT
 ACTACAGGTTATTACACTACAACATAATTATGATACGGTTAATATGGTATCACACT
 GCGACTTTTATATCATACCAAGATCCGAGGAAAGCACATGCACAAATTACATAAA

TAATGGATTACCACCAATACAAAATACTAGAAATGTAGTACCAGTATCTTTAACA
TCTAGGTCAATTGTTTCATACTAGAGCACAAGCGAATGAAGACATTGTTATATCG

> PGRV19/ BOITUVA

AATTGCTTACAAACTCGTACACAACCTGATCTATCTGATGAAATCGAAGAAATTGG
ATCATCAAAATCACAAGATGTTACAATAAATCCAGGACCATTTGCTCAAACCTGGA
TACGCCCCAGTTAACTGGGGTCCTGGTGAGACTAACGACTCAACAACGGTTGAAC
CAGTGTTAGACGGACCATATCAACAAACGACCTTTAATCCACCAATAGAATATTG
GACGTTATTTGCTCCCAATGATAAAGGCGTAGTCGCTGAATTGACAAATAACATA
GATATATGGTTAGTCATTATCTTAATTGAACCAAATGTACCCCAAGAGTCGAGAA
CGTATACTATATTCGGTCAGCGAGTTAGCCTGGTGATCGAAAATGCATCACAAC
GAAATGGAAATTCATTGATTTTGGTAGAAGAAATCAAAATGATACTTATATGCTG
TATGGTACACTTTTATCAGATACGAAACTGCAGGCTGCAATGAAATATGGAGCAA
GATTATTTACATTTATCGGAGATACACCGAATGCAGCGCCACAGGAATACGGATA
TGAGACAACCAATTACAGTGCAATTGGAATAAGATCTTTTTTGTGATTTTTTACATA
ATACCACGTATGCCACGAGAAGTGTGCAGAAATTATATTAATCAAGGTCTTCCAC
CAATGCAGAATACTAGAAACGTGGTATCAGTTGCATTGTCAGCTAGAGATGTAGT
AATGCGAAGAACGAGTGTTAATGAAGATATCGTCATATCTAAAACCTTCACTA

> PGRV20/ BOITUVA

ATGCTTACAAACTCGTACACAACCTGATCTATCTGATGAAATCGAAGAAATTGGAT
CATCAAAATCACAAGATGTTACAATAAATCCAGGACCATTTGCTCAAACCTGGATA
CGCCCCAGTTAACTGGGGTCCTGGTGAGACTAACGACTCAACAACGGTTGAACCA
GTGTTAGACGGACCATATCAACAAACGACCTTTAATCCACCAATAGAATATTGGA
CGTTATTTGCTCCCAATGATAAAGGCATAGTCGCTGAATTGACAAATAACATAGA
TATATGGTTAGTCATTATCTTAATTGAACCAAATGTACCCCAAGAGTCGAGAACG
TATACTATATTCGGTCAGCGAGTTAGCCTGGTGATCGAAAATGCATCACAACGA
AATGGAAATTCATTGATTTTGGTAGAAGAAATCAAAATGATACTTATATGCTGTA
TGGTACACTTTTATCAGATACGAAACTGCAGGCTGCAATGAAATATGGAGCAAGA
TTATTTACATTTATCGGAGATACACCGAATGCAGCGCCACAGGAATACGGATATG
AGACAACCAATTACAGTGCAATTGGAATAAGATCTTTTTTGTGATTTTTTACATAAT
ACCACGTATGCCACGAGAAGTGTGCAGAAATTATATTAATCAAGGTCTTCCACCA
ATGCAGAATACTAGAAACGTGGTATCAGTTGCATTGTCAGCTAGAGATGTAGTAA
TGCGAAGAACGAGTGTAATGAAGATATCGTCATATCTAAAACCTTCACTAT

>PGRV21/ BOITUVA

ATGCTTACAAACTCGTACACAACCTGATCTATCTGATGAAATCGAAGAAATTGGAT
CATCAAAATCACAAGATGTTACAATAAATCCAGGACCATTTGCTCAAACCTGGATA
CGCCCCAGTTAACTGGGGTCCTGGTGAGACTAACGACTCAACAACGGTTGAACCA
GTGTTAGACGGACCATATCAACAAACGACCTTTAATCCACCAATAGAATATTGGA
CGTTATTTGCTCCCAATGATAAAGGCATAGTCGCTGAATTGACAAATAACATAGA
TATATGGTTAGTCATTATCTTAATTGAACCAAATGTACCCCAAGAGTCGAGAACG
TATACTATATTCGGTCAGCGAGTTAGCCTGGTGATCGAAAATGCATCACAACGA
AATGGAAATTCATTGATTTTGGTAGAAGAAATCAAAATGATACTTATATGCTGTA
TGGTACACTTTTATCAGATACGAAACTGCAGGCTGCAATGAAATATGGAGCAAGA
TTATTTACATTTATCGGAGATACACCGAATGCAGCGCCACAGGAATACGGATATG
AGACAACCAATTACAGTGCAATTGGAATAAGATCTTTTTTGTGATTTTTTACATAAT
ACCACGTATGCCACGAGAAGTGTGCAGAAATTATATTAATCAAGGTCTTCCACCA
ATGCAGAATACTAGAAACGTGGTATCAGTTGCATTGTCAGCTAGAGATGTAGTAA
TGCGAAGAACGAGTGTTAATGAAGATATCGTCATATCTA

>PGRV22/ ITÚ

AGAATTGGGTCATCAAGATCACAGGATGTAACAATAAATCCAGGACCATTTGCTC
 AAACCTGGATACGCTCCAGTAAATTGGGGCCCAGGTGAGACGAACGATTCAACAA
 CAATTGAACCAGTGTTAGACGGACCATATCAACCAACGACTTTTAATCCACCGAT
 AGAATATTGGACGTTATTCGCTCCCAATGACAAGGGTGTAGTTGCTGAATTGACA
 AACAATACAGATATATGGTTAGTCATTATCCTAATTGAACCAAATGCATCTCGAG
 AACTCAGAACGTACACTGTATTCGGTCAACAGGTAAACCTAACGGTAGAGAATAC
 ATCACAACAAAATGGAAATTTGCTGATTTTAGTAGAAGAAGTCAAAATGATACT
 TACGTGTCTAATGACACACTTTTATCAGATGTAAAACCTGCAGGCTGCAATGAAAT
 ATGGAGCAAGGTTATTTACATTCCTGGAGATACACCGAATGCAGCGCCACAGG
 AATTTGGATATACAATAACAATAAGTGCCATTGAGATACGATCATTTTGTGA
 TTTTACATAATACCGCGCATACCACGAGAGGTGTGTAGAACTATATTAATCAC
 GGTCTTCCACCAATGCAAAATACTAGAAATGTAGTATCAGTCGCATTATCAGCTA
 GGAAGCAGTAATACAAAAGTGAGTGTTAATGAAGACATCGTTATATCTAAAA
 CTTCTTTATGGAAAGAAATGCAGTATAATAGAGATATTACAATTAGATCAAGTTG
 C

>PGRV23/ ITÚ

TAAATCCAGGACCATTTGCTCAAACCTGGATACGCTCCAGTAAATTGGGGCCCAGG
 TGAGACGAACGATTCAACAACAATTGAACCAGTGTTAGACGGACCATATCAACC
 AACGACTTTTAATCCACCGATAGAATATTGGACGTTATTCGCTCCCAATGACAAG
 GGTGTAGTTGCTGAATTGACAAACAATACAGATATATGGTTAGTCATTATCCTAA
 TTGAACCAAATGCATCTCGAGAACTCAGAACGTACACTGTATTCGGTCAACAGGT
 TAACCTAACGGTAGAGAATACATCACAACAAAATGGAAATTTGCTGATTTTAGT
 AGAAGAAGTCAAAATGATACTTACGTGTCTAATGACACACTTTTATCAGATGTAA
 AACTGCAGGCTGCAATGAAATATGGAGCAAGGTTATTTACATTCCTGGAGATAC
 ACCGAATGCAGCGCCACAGGAATTTGGATATACAATAACAATAAGTGCCATT
 GAGATACGATCATTTTGTGATTTTACATAATACCGCGCATACCACGAGAGGTGT
 GTAGAACTATATTAATCACGGTCTTCCACCAATGCAAAATACTAGAAATGTAGT
 ATCAGTCGCATTATCAGCTAGGGAAGCAGTAATACAAAAGTGAGTGTTAATGA
 AGACATCGTTATATCTAAAACCTTCTTTATGGAAAGAAATGCAGTATA

> PGRV24/ ITÚ

AGTACTTGACGGTCCATATCAACCTACTACATTTAATCCACCAGTAAGTTATTGG
 ATACTATTGTCTCCATCTAATGCAGGAGTAGTAGTGGAAGGAACAAACAATTTAG
 ACAGGTGGTTGGCTACTATACTAATTGAGCCGAATGTACCATCACAAGCAGAAT
 ATACACTTTATTTGGACAACAAGAACAATAACAGTTGAAAATGTTTCAACAACG
 AAATGGAAGTTTGTAGATCTGGCTAAAACCTGATATCAATGGAACATATACGCAGC
 ATGGGCCATTACTTTCAGATACAAAACCTATATGGAGTGATGAAATTTAGTAGCAG
 ACTATATACCTACAATGGTGAAACACCGAATGCAACTACTGGTTATTATACCACA
 ACTAATTATGACACGGTAAACATGACATTACATTGTGACTTTTACATTATACCAC
 GATCTGAAGAAAGCACATGCACGAATTATGTTAATAATGGATTACCACCAATGCA
 GAATACTAGGAATGTGGTTCCAGTGTCTCTAACTTCTAGATCAATTGTACACACT
 AGAGCTCAGGCAAATGAAGATATTATTGTATCAAAAACCTCATTATGGAAAGAA
 ATGCAGTATAATAGAGATATAACCATACGTT

> PGRV25/ IBIÚNA

GTAGAACCAGTTTTGGACGGGCCGTACCAACCTACGACTTTTAATCCGTCAATAG
 AGTATTGGACATTATTTGCTCCTAATAATAAAGGTGTGATAGCTGAAATGACAAA
 TAATAATAGTATATGGCTGGCTACTGTTTTAATTGAACCAAATGTTTCTCAAGAAC

TAAGGACATACACAATATTTGGTCAACAAGTTGGGTTAGTGGTTGAAAATACTTC
 GCAAACAAAGTGGAAATTCATAGACTTTGGTAGAAACAGTCAAACCTGATAGCTA
 TACAAATTATGGCACGCTTTTATCAGAAACGAAATTACAGGCTGCGATGAAGTAT
 GGAGGAAAATTATTCACATTTATTGGCGACACGCCAAATGCAGCACCATATGAAT
 GGGGATATGTGACGAATAATTATGATATGATTGTGATAACTTCATATTGTGATTTT
 TACATAGTTCCACGTCTACCACGAGAAATTTGTAGAAATTATATTAATCATGGAC
 TTCCGCCTATGCAAAACACGAGGAATATAATACCAGTTGCATTATCAGCTAGAGA
 CATTGTAACACAAAGAGCAAGTGTTAATGAAGATATAGTTATATCAAAAACCTTCT
 TTATGGAAAGAAATGCAATATAATAGGGATATTGTAATTAGATTTAAATTTGCTA
 ATCAAATA

> PGRV26/ ITÚ

AACTGGATACGCTCCGTTAAATTGGGGCCCAGGGGAGACGAACGATTCAACAAC
 AATTGAACCAGTGTTAGACGGACCATATCAACCAACGACTTTTAATCCCTTGATA
 GAATATTGGACGTTATTCGCTCCCAATGACAAGGGTGTTAGTTGCTGAATTGACAA
 ACAATACAGATATATGGTTAGTCATTATCCTAATTGAACCAAATGCATCTCGAGA
 ACTCAGAACGTACACTGTATTCGGTCAACAGGTAAACCTAACGGTAGAGAATACA
 TCACAAACAAAATGGAAATTTGCTGATTTTAGTAGAAGAAGTCAAAATGATACTT
 ACGTGTCTAATGACACACTTTTATCAGATGTAAAACCTGCAGGCTGCAATGAAATA
 TGGAGCAAGGTTATTTACATTCCTGAGATACACCGAATGCAGCGCCACAGGA
 ATTTGGATATACAACCTAACAACCTACAGTGCCATTGAGATACGATCATTTTGTGAT
 TTTTACATAATACCGCGCATACCACGAGAGGTGTGTAGAACTATATTAATCACG
 GTCTTCCACCAATGCAAAATACTAGAAATGTAGTATCAGTCGCATTATCAGCTAG
 GGAAGCAGTAAAACAAAAGTGAGTGTTAATGAAGACATCGTTATATCTT

> PGRV27/ ITÚ

AGAATTGGGTCATCAAGATCACAGGATGTAACAATAAATCCAGGACCATTGCTC
 AAACCTGGATACGCTCCAGTAAATTGGGGCCCAGGTGAGACGAACGATTCAACAA
 CAATTGAACCAGTGTTAGACGGACCATATCAACCAACGACTTTTAATCCACCGAT
 AGAATATTGGACGTTATTCGCTCCCAATGACAAGGGTGTTAGTTGCTGAATTGACA
 AACAATACAGATATATGGTTAGTCATTATCCTAATTGAACCAAATGCATCTCGAG
 AACTCAGAACGTACACTGTATTCGGTCAACAGGTAAACCTAACGGTAGAGAATAC
 ATCACAAACAAAATGGAAATTTGCTGATTTTAGTAGAAGAAGTCAAAATGATACT
 TACGTGTCTAATGACACACTTTTATCAGATGTAAAACCTGCAGGCTGCAATGAAAT
 ATGGAGCAAGGTTATTTACATTCCTGAGATACACCGAATGCAGCGCCACAGG
 AATTTGGATATACAACCTAACAACCTACAGTGCCATTGAGATACGATCATTTTGTGA
 TTTTACATAATACCGCGCATACCACGAGAGGTGTGTAGAACTATATTAATCAC
 GGTCTTCCACCAATGCAAAATACTAGAAATGTAGTATCAGTCGCATTATCAGCTA
 GGAAGCAGTAATACAAAAGTGAGTGTTAATGAAGACATCGTTATATCTAAAA
 CTTCTTTATGGAAAGAAATGCAGTATAATAGAGATATTACAATTAGATCAAGTTG
 C

> PGRV28/ ITÚ

TCCAGTAAATTGGGGCCCAGGTGAGACGAACGATTCAACAACAATTGAACCAGT
 GTTAGACGGACCATATCAACCAACGACTTTTAATCCACCGATAGAATATTGGACG
 TTATTCGCTCCCAATGACAAGGGTGTTAGTTGCTGAATTGACAAACAATACAGATA
 TATGGTTAGTCATTATCCTAATTGAACCAAATGCATCTCGAGAACTCAGAACGTA
 CACTGTATTCGGTCAACAGGTAAACCTAACGGTAGAGAATACATCACAAACAAA
 ATGGAAATTTGCTGATTTTAGTAGAAGAAGTCAAAATGATACTTACGTGTCTAAT
 GACACACTTTTATCAGATGTAAAACCTGCAGGCTGCAATGAAATATGGAGCAAGGT

TATTTACATTCACTGGAGATACACCGAATGCAGCGCCACAGGAATTTGGATATAC
 AACTAACAACACTACAGTGCCATTGAGATACGATCATTTTGTGATTTTACATAATAC
 CGCGCATACACGAGAGGTGTGTAGAACTATATTAATCACGGTCTTCCACCAAT
 GCAAAATACTAGAAATGTAGTATCAGTCGCATTATCAGCTAGGGAAGCAGTAAT
 ACAAAAAGTGAGTGTTTATGATCACATCGTTATA

> PGRV29/ BOITUVA

GCTACTCACTAATTCATACGCAGTTGAGCTATCAGATGAAATTAATACGATTGGA
 TCAGAGAAAAATCAAAGTGTAACAATTAACCCCGGACCGTTTGCTCAAACAAATT
 ATGCACCAGTGACTTGGAGTCATGGAGAAGTAAATGATTCAACAACAATAGAAC
 CAGTACTCGATGGTCCTTATCAACCGACAAGTTTAAACCACCAGATGATTACTG
 GATATTATTGAATCCAACTAGTCAGCAAATTGTATTAGAGGGTACCAATAGAACA
 GATGTTTGGGTTGCTTTATTACTTATTGAGCCGAACGTAACCAATCAAAGTAGAC
 AGTACACGTTATTTGGAGAAATGAAACAAATTACTGTGGAAAATAGCACAAGCA
 AATGGAAATTCTTTGAAATGTTTAGAAGCAATGCTAGTGCTGAATTTCAACATAA
 ACGTACTTTAACATCAGATACTAAGTTAGCTGGGTTTTTGAAGCATGGTGGACGT
 GTTTGGACTTTTCACGGTGAAACACCAAATGCTACGACTGATTATTCATCAACCTC
 AAACCTTATCTGAAATAGAACTGTAATACATACTGAATTTTATATAATACCAAGA
 TCACAGGAATCTAAGTGTAAGGAATACATAAATACTGGACTGCCACCAATGCAG
 AATACAAGGAATATAGTTCAGTTGCGCTATCGTCTAGATCAGTGACTCATCAAC
 GTGCTCAAGTTAATGAAGATATCATCATATCAAAGACGTCGTTGTGGAAGGAAAT
 GCAATATAACAGAGACATTGTAATAAGATTTAAATTTAATAATAGTATAGTAAAA
 CTCGGTGG

> PGRV30/ ITÚ

ATGAAATACGAACTATTGGTTCTGAGAGAACACAAAATGTAACAATAAACCCAG
 GACCATTGCTCAAACCTGGATACGCACCAGTGAATTGGGGACCTGGGGAAACAA
 ATGATTCAACAACAGTCGAACCAGTACTTGACGGTCCATATCAACCTACTACATT
 TAATCCACCAGTAAGTTATTGGATACTATTGTCTCCGTCTAATGCAGGAGTAGTA
 GTGGAAGGAACAAACAATTCAGACAGGTGGTTGGCTACTATACTAATTGAACCA
 AATGTACCATCACAAATCAGAATATACACTTTATTTGGACAACAAGAACAGATAA
 CAGTTGAAAATGTTTCAACAACGAAATGGAAATTTGTGGATCTGGCTAAAACCTGA
 TATCAATGGAACATATACGCAGCATGGACCATTGCTTTCAGATACAAAACCTCTAT
 GGAGTGATGAAATTTAGTAGCAGACTATATACCTACAATGGTGAGACACCGAAT
 GCAACTACTGGTTATTATACCCTACTAATTATGACACAGTAGACATGACATTAC
 ATTGTGACTTTTACATTATACCACGATCTGAAGAAAGTGCATGCACGAGTTATGT
 CAATAATGGATTACCACCAATGCAGAATACTAGGAATGTGGTTCCAGTGTCTCTA
 ACTTCTAGATCGATTGTACACACTAGAGCTCAGGCAAATGAAGATATTATTGTAT
 CAAAACCTACATTATGGAA

> PGRV31/ ITÚ

AGTAAATTGGGGCCCAGGTGAGACGAACGATTCAACAACAATTGAACCAGTGTT
 AGACGGACCATATCAACCAACGACTTTTAAATCCACCGATAGAATATTGGACGTTA
 TTCGCTCCCAATGACAAGGGTGTAGTTGCTGAATTGACAAACAATACAGATATAT
 GGTTAGTCATTATCCTAATTGAACCAAATGCATCTCGAGAACTCAGAACGTACAC
 TGTATTCCGGTCAACAGGTAAACCTAACGGTAGAGAATACATCACAAACAAAATG
 GAAATTTGCTGATTTTAGTAGAAGAAGTCAAATGATACTTACGTGTCTAATGAC
 ACACTTTTATCAGATGTAAAACTGCAGGCTGCAATGAAATATGGAGCAAGGTTAT
 TTACATTCACTGGAGATACACCGAATGCAGCGCCACAGGAATTTGGATATACAAC
 TAACAACCTACAGTGCCATTGAGATACGATCATTTTGTGATTTTACATAATACCGC

GCATACCACGAGAGGTGTGTAGAACTATATTAATCACGGTCTTCCACCAATGCA
AAATACTAGAAATGTAGTATCAGTCGCATTATCAGC

> PGRV32/ PEDRA BELA

GAAAATCAAAATGTAACAATCAACCCCGGACCGTTTGCTCAAACAAATTACGCAC
CAGTGAAGTGGAGTCATGGGGAAGTGAATGATTCAACAACAATAGAACCAGTAC
TCGATGGTCCCTATCAACCAACAAGTTTTAAACCACCAAATGATTACTGGATATT
ATTAAATCCAACATAATCAGCAAATTGTATTAGAGGGTACGAATAGAACAGATGTT
TGGATTGCTTTATTACTTGTGTAACCGAACGTAACCAATCAAAGTAGACAGTATA
CGTTATTTGGAGAAACGAAACAAATTACTGTGGAAAATAACACAAACAAATGGA
AATTCCTTTGAGATGTTTCAGAAACAATGCTAGTGCTGAATTCCAACATAAGCGTAC
TTAACATCAGATACTAAGTTAGCTGGGTTTTTAAAACATGGTGGACGTGTTTGG
ACTTTTCACGGTGAAACGCCAAATGCTACGACTGATTACTCATCAACTTCAAAC
TATCTGAAATAGAACTGTAATACATACTGAGTTTTATATAATACCAAGATCACA
GGAATCTAAGTGTAAGGAATATATAAACACTGGACTGCCACCAATGCAGAATAC
AAGGAATGTAGTTCCAGTTGCGCTATCATCTAGATCAGTGACCTATCAGCGTGCT
CAAGTTAATGAAGATATTATCATATCAAAGACGTCGTTGTGGAAGGAAATGCAAT
AT

> PGRV33/ PEDRA BELA

GACTATCAGATGAGATTACCACGATTGGATCAGAGAAAAATCAAAATGTAACAA
TCAACCCCGGACCGTTTGCTCAAACAAATTACGCACCAGTGAAGTGGAGTCATGG
GGAAGTGAATGATTCAACAACAATAGAACCAGTACTCGATGGTCCCTATCAACCA
ACAAGTTTTAAACCACCAAATGATTACTGGATATTATTAAATCCAACATAATCAGC
AAATTGTATTAGAGGGTACGAATAGAACAGATGTTTGGATTGCTTTATTACTTGT
GAACCGAACGTAACCAATCAAAGTAGACAGTATACGTTATTTGGAGAAACGAAA
CAAATTACTGTGGAAAATAACACAAACAAATGGAAATTCTTTGAGATGTTTCAGAA
ACAATGCTAGTGCTGAATTCCAACATAAGCGTACTTTAACATCAGATACTAAGTT
AGCTGGGTTTTTAAAACATGGTGGACGTGTTTGGACTTTTCACGGTGAAACGCCA
AATGCTACGACTGATTACTCATCAACTTCAAACCTTATCTGAAATAGAACTGTAA
TACATACTGAGTTTTATATAATACCAAGATCACAGGAATCTAAGTGTAAGGAATA
TATAAACACTGGACTGCCACCAATGCAGAATACAAGGAATGTAGTTCCAGTTGCG
CTATCATCTAGATCAGTGACCTATCAGCGTGCTCAAGTTAATGAAGATATTATCA
TATCAAAGACGTCGTTGTGGAAGGAAATGCAATATAACAGAGACATTATAATAA
GATCA

> PGRV34/ PEDRA BELA

TAGACAGCTACTACTAATTCATACACAGTTGAACTATCAGATGAGATTACCACG
ATTGGATCAGAGAAAAATCAAAATGTAACAATCAACCCCGGACCGTTTGCTCAA
ACAAATTACGCACCAGTGAAGTGGAGTCATGGGGAAGTGAATGATTCAACAACA
ATAGAACCAGTACTCGATGGTCCCTATCAACCAACAAGTTTTAAACCACCAAATG
ATTACTGGATATTATTAAATCCAACATAATCAGCAAATTGTATTAGAGGGTACGAA
TAGAACAGATGTTTGGATTGCTTTATTACTTGTGTAACCGAACGTAACCAATCAA
AGTAGACAGTATACGTTATTTGGAGAAACGAAACAAATTACTGTGGAAAATAAC
ACAAACAAATGGAAATTCTTTGAGATGTTTCAGAAACAATGCTAGTGCTGAATTCC
AACATAAGCGTACTTTAACATCAGATACTAAGTTAGCTGGGTTTTTAAAACATGG
TGGACGTGTTTGGACTTTTCACGGTGAAACGCCAAATGCTACGACTGATTACTCA
TCAACTTCAAACCTTATCTGAAATAGAACTGTAATACATACTGAGTTTTATATAAT
ACCAAGATCACAGGAATCTAAGTGTAAGGAATATATAAACACTGGACTGCCACC

AATGCAGAATACAAGGAATGTAGTTCCAGTTGCGCTATCATCTAGATCAGTGACC
TATCAGCGTGCTCAAGTTAATGAAGATATTATCATATCAAAGACGTCGTTGTGG