LAILA ANDREIA RODRIGUES BESERRA

**Análise multigênica de rotavírus do grupo A em aves de criações
comerciais brasileiras**

São Paulo

2017

LAILA ANDREIA RODRIGUES BESERRA

**Análise multigênica de rotavírus do grupo A em aves de criações
comerciais brasileiras**

Tese 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 a obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às
Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Fabio Gregori

São Paulo

2017

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

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

T. 3493
FMVZ

Beserra, Laila Andreia Rodrigues
Análise multigênica de rotavírus do grupo A em aves de criações comerciais
brasileiras / Laila Andreia Rodrigues Beserra. – 2017.
112 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde
Animal, São Paulo, 2017.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às
Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Gregori.

1. Aves. 2. Rotavírus. 3. Genótipos. 4. Recombinação. 5. Códon. 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 "Análise multigênica de rotavírus do grupo A em aves de criações comerciais brasileiras", protocolado sob o nº 3070/2013, utilizando 250 (duzentas e cinquenta) aves, sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. Fábio Gregory, foi aprovado em reunião de 14/8/2013 e 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.

We certify that the Research "Multigenic analysis of group A rotavirus in birds from Brazilian poultry forms", protocol number 3070/2013, utilizing 250 (two hundred and fifty) birds, under the responsibility Prof. Dr. Fábio Gregory, was approved in the meeting of day 8/14/2013 and 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.

São Paulo, 14 de agosto de 2013.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: BESERRA, Laila Andreia Rodrigues

Título: **Análise multigênica de rotavírus do grupo A em aves de criações comerciais brasileiras**

Tese 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 Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, João e Elânia.

À minha irmã Louanne.

AGRADECIMENTOS

Ao orientador Prof. Dr. Fabio Gregori pela dedicação em me orientar e pelos ensinamentos compartilhados.

Nunca poderei agradecer suficientemente aos meus pais, João e Elânia, por tudo que fizeram e ainda fazem por mim.

À minha irmã, Louanne Beserra, por seu exemplo de força e determinação.

Ao meu cunhado, Rafael Leite, pelo cuidado e atenção sempre dirigidos a mim.

Aos meus sobrinhos, Rafinha e João Pedro, por despertarem um amor imensurável em mim.

À família Sobral por me ensinar a ser feliz diante das adversidades.

À família Beserra por sempre me acolher tão bem.

Aos meus amigos, Evaldo, Bruno, Thalita, Nyanne, Ruanna e Juliana, por me mostrarem que uma verdadeira amizade permanece mesmo à distância.

Aos amigos conquistados no VPS, Nara Bernardes, Juliana Martins, Gisele Oliveira, Giselle Ayres, Israel Guedes, Antônio, Fernanda Dornelas, Marco Gattamorta e Patrícia Favaro, por tornarem mais leve essa caminhada.

Às técnicas do Labmas, Sueli Taniwaki e Sheila Oliveira, pela amizade e apoio técnico.

À todos os funcionários do VPS.

Agradecimento à Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
(CAPES)

C A P E S

Pela concessão da bolsa

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

Pelo auxílio financeiro ao projeto
(Nº do processo 2014/13531-7)

RESUMO

BESERRA, L A R. **Análise multigênica de rotavírus do grupo A em aves de criações comerciais brasileiras.** [Multigenic analysis of avian rotavirus in Brazil]. 2017. 112 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Os rotavírus, membros da família *Reoviridae*, são uma importante causa de diarreia em mamíferos e aves. São partículas icosaédricas não envelopadas e seu genoma é formado por 11 segmentos de RNA fita dupla que codificam seis proteínas estruturais e seis proteínas não estruturais. O objetivo deste estudo foi caracterizar os genes codificadores das proteínas não estruturais (NSP1-5) e estruturais (VP1-4, VP6-7) dos rotavírus do grupo A em aves de criações comerciais (corte, postura, matrizeiros e avozeiros) localizadas em 12 estados brasileiros, seguido de análises de recombinação e pressão de seleção das amostras definidas. Um total de 226 amostras fecais foram triadas através de reações de RT-PCR tendo como alvo a amplificação da VP6 e NSP5. A frequência de ocorrência, baseada em cada uma destas provas, variou de 9,7% a 18,14%, respectivamente. Em seguida, 10 das amostras positivas foram processadas com *primers* específicos visando a amplificação dos demais genes, seguido do sequenciamento nucleotídico e filogenia baseada no método de *maximum likelihood*, tendo como modelos de substituição GTR (NSP1-3, VP1-3, VP4, VP6, VP7) e HKY (NSP4, NSP5) e 1.000 repetições de *bootstrap*. Foram definidas sequências parciais para os genes codificadores da VP1-4, VP6-7 e NSP1-4 e sequências completas para NSP5. As respectivas árvores demonstraram que as dez amostras definidas se agruparam em clados aviários previamente descritos. Duas constelações genotípicas foram caracterizadas: G19-P[31]-I11-R6-C6-M7-A16-N6-T8-E10-H8 e G19-P[31]-I4-R4-C4-M4-A16-N4-T4-E4-H4. Estes genótipos são tipicamente encontrados em aves, mas quando analisados em conjunto, esta é a primeira descrição destas constelações. Eventos de recombinação foram observados nos genes NSP2, VP1, VP3 e VP7. Pelo menos um códon com pressão de seleção positiva foi encontrado nos genes codificadores das proteínas NSP1, VP2 e VP3. Este estudo propicia um melhor entendimento acerca da

epidemiologia e diversidade viral circulante nas criações aviárias brasileiras, servindo de base para o estabelecimento de medidas profiláticas mais eficazes.

Palavras-chave: Aves. Rotavírus. Genotipos. Recombinação. Códon.

ABSTRACT

BESERRA, L A R. **Multigenic Analysis of Avian Rotavirus in Brazil**. [Análise multigênica de rotavírus do grupo A em aves de criações comerciais brasileiras]. 2017. 112 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Rotaviruses are members of the *Reoviridae* family and they are a common cause of acute diarrhea in several mammalian and avian species. They are non-enveloped icosahedral particles and its genome comprises 11 segments of double-stranded RNA, which encodes six structural proteins (VP1-4, VP6-7) and six nonstructural proteins (NSP1-6). The objective of this study was to characterize the RVA nonstructural and structural proteins coding genes (NSP1-NSP5, VP1-VP4, VP6 and VP7) from fecal samples from avian farms (broiler breeders, poultry, laying hens, and grandparents) raised in Brazilian commercial farms from 12 states, followed by recombination and selection pressure analysis from samples defined here. A total of 226 fecal samples were screened using a RT-PCR technique targeting the amplification of the VP6 and NSP5. The frequency of occurrence, using these techniques, ranging from 9.7% to 18,14%, respectively; and from these, ten samples were further processed with specific primers to amplify the remaining genes, followed by respective nucleotide sequencing of the amplicons and phylogeny based on method maximum likelihood, as substitutions models GTR (NSP1-3, VP1-3, VP4, VP6, VP7) and HKY (NSP4, NSP5) and 1.000 bootstrap repetitions. Partial nucleotide sequences of VP1-4, VP6-7, and NSP1-4, and complete from NSP5, were obtained in this study. The phylogenetic trees depicted that the ten Brazilian rotavirus strains segregated with previous avian RVA described elsewhere. Two avian genotype constellations have been characterized here: G19-P[31]-I11-R6-C6-M7-A16-N6-T8-E10-H8, and G19-P[31]-I4-R4-C4-M4-A16-N4-T4-E4-H4. These genotypes are typically found in avian species, although when analyzed together, this is the first report of such constellations. Recombination events were observed in NSP2, VP1, VP3, and VP7 coding genes. At least on positive selected site was observed in NSP1, VP2, and VP3 genes. This study provides a better understanding of rotavirus epidemiology, by the definition of genetic variability of circulating strains.

Keywords: Avian. Rotavirus. Genotypes. Recombination. Codons.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática da partícula de rotavírus, segmentos genômicos e respectivas proteínas codificadas.....	25
Figura 2 - Fluxograma de procedimentos aplicados nas amostras fecais aviárias.....	38
Figura 3 - Árvore filogenética construída com o critério de <i>maximum likelihood</i> baseada na região parcial do gene codificador da NSP1 dos RVAs. As amostras apresentam a identificação RVA/hospedeiro/país/amostra/ano/genótipo G e P. Os números próximos a cada nó representam os valores de <i>bootstrap</i> (1.000 repetições) e a escala representa o número de substituições/sítio. Os triângulos representam as sequências aqui definidas - São Paulo - 2017.....	50
Figura 4 - Árvore filogenética construída com o critério de <i>maximum likelihood</i> baseada na região parcial do gene codificador da NSP2 dos RVAs. As amostras apresentam a identificação RVA/hospedeiro/país/amostra/ano/genótipo G e P. Os números próximos a cada nó representam os valores de <i>bootstrap</i> (1.000 repetições) e a escala representa o número de substituições/sítio. Os triângulos representam as sequências aqui definidas - São Paulo - 2017	51
Figura 5 - Árvore filogenética construída com o critério de <i>maximum likelihood</i> baseada na região parcial do gene codificador da NSP3 dos RVAs. As amostras apresentam a identificação RVA/hospedeiro/país/amostra/ano/genótipo G e P. Os números próximos a cada nó representam os valores de <i>bootstrap</i> (1.000 repetições) e a escala representa o número de substituições/sítio. Os triângulos representam as sequências aqui definidas - São Paulo - 2017	52

- Figura 6 - Árvore filogenética construída com o critério de *maximum likelihood* baseada na região parcial do gene codificador da NSP4 dos RVAs. As amostras apresentam a identificação RVA/hospedeiro/país/amostra/ano/genótipo G e P. Os números próximos a cada nó representam os valores de *bootstrap* (1.000 repetições) e a escala representa o número de substituições/sítio. Os triângulos representam as sequências aqui definidas - São Paulo - 201753
- Figura 7 - Árvore filogenética construída com o critério de *maximum likelihood* baseada na região parcial do gene codificador da NSP5 dos RVAs. As amostras apresentam a identificação RVA/hospedeiro/país/amostra/ano/genótipo G e P. Os números próximos a cada nó representam os valores de *bootstrap* (1.000 repetições) e a escala representa o número de substituições/sítio. Os triângulos representam as sequências aqui definidas - São Paulo - 201754
- Figura 8 - Árvore filogenética construída com o critério de *maximum likelihood* baseada na região parcial do gene codificador da VP1 dos RVAs. As amostras apresentam a identificação RVA/hospedeiro/país/amostra/ano/genótipo G e P. Os números próximos a cada nó representam os valores de *bootstrap* (1.000 repetições) e a escala representa o número de substituições/sítio. Os triângulos representam as sequências aqui definidas - São Paulo - 201755
- Figura 9 - Árvore filogenética construída com o critério de *maximum likelihood* baseada na região parcial do gene codificador da VP2 dos RVAs. As amostras apresentam a identificação RVA/hospedeiro/país/amostra/ano/genótipo G e P. Os números próximos a cada nó representam os valores de *bootstrap* (1.000 repetições) e a escala representa o número de substituições/sítio. Os triângulos representam as sequências aqui definidas - São Paulo - 201756

Figura 10 - Árvore filogenética construída com o critério de *maximum likelihood* baseada na região parcial do gene codificador da VP3 dos RVAs. As amostras apresentam a identificação RVA/hospedeiro/país/amostra/ano/genótipo G e P. Os números próximos a cada nó representam os valores de *bootstrap* (1.000 repetições) e a escala representa o número de substituições/sítio. Os triângulos representam as sequências aqui definidas - São Paulo - 2017..... 57

Figura 11 - Árvore filogenética construída com o critério de *maximum likelihood* baseada na região parcial do gene codificador da VP4 dos RVAs. As amostras apresentam a identificação RVA/hospedeiro/país/amostra/ano/genótipo G e P. Os números próximos a cada nó representam os valores de *bootstrap* (1.000 repetições) e a escala representa o número de substituições/sítio. Os triângulos representam as sequências aqui definidas - São Paulo - 2017..... 58

Figura 12 - Árvore filogenética construída com o critério de *maximum likelihood* baseada na região parcial do gene codificador da VP6 dos RVAs. As amostras apresentam a identificação RVA/hospedeiro/país/amostra/ano/genótipo G e P. Os números próximos a cada nó representam os valores de *bootstrap* (1.000 repetições) e a escala representa o número de substituições/sítio. Os triângulos representam as sequências aqui definidas - São Paulo - 2017..... 59

Figura 13 - Árvore filogenética construída com o critério de *maximum likelihood* baseada na região parcial do gene codificador da VP7 dos RVAs. As amostras apresentam a identificação RVA/hospedeiro/país/amostra/ano/genótipo G e P. Os números próximos a cada nó representam os valores de *bootstrap* (1.000 repetições) e a escala representa o número de substituições/sítio. Os triângulos representam as sequências aqui definidas - São Paulo - 2017 60

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Definição dos genótipos dos 11 segmentos dos rotavírus baseado nos valores de corte de percentual de similaridade de nucleotídeos	26
Quadro 2 - Descrição dos primers, respectivas sequências e tamanhos dos produtos (pb), desenhados e de literatura, utilizados no estudo – São Paulo – 2017	41
Quadro 3 - Tempo e temperaturas de amplificação dos genes estudados – São Paulo – 2016	42
Quadro 4 - Identificação das amostras e constelações de genótipos definidos no estudo – São Paulo – 2017	61
Quadro 5 - Eventos de recombinação detectados nas amostras aviárias geradas no estudo, de acordo com métodos disponíveis no programa RDP4 – São Paulo – 2017	62
Quadro 6 - Análises de pressão de seleção e posições dos códons, de cada uma das proteínas estudadas, onde foi encontrada pressão positiva – São Paulo – 2017	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Definição dos genotipos dos 11 segmentos dos rotavírus baseado nos valores de corte de percentual de similaridade de nucleotídeos	46
--	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	21
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	23
2.1 HISTÓRICO DOS ROTAVÍRUS.....	23
2.2 ESTRUTURA E CLASSIFICAÇÃO.....	24
2.3 PROTEÍNAS VIRAIS ESTRUTURAIS.....	27
2.4 PROTEÍNAS VIRAIS NÃO ESTRUTURAIS.....	29
2.5 REPLICAÇÃO.....	30
2.6 EVOLUÇÃO VIRAL.....	32
2.7 DIAGNÓSTICO.....	34
2.8 PREVENÇÃO E CONTROLE.....	35
3 OBJETIVOS.....	37
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
4.1 FLUXOGRAMA DE TRABALHO.....	38
4.2 AMOSTRAS.....	38
4.3 EXTRAÇÃO DO RNA DE ROTAVÍRUS AVIÁRIO.....	39
4.4 REAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO REVERSA (RT) E PCR.....	39
4.5 REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO NUCLEOTÍDICO.....	42
4.6 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS.....	43
4.7 ANÁLISE FILOGENÉTICA.....	43
4.8 ANÁLISE DE RECOMBINAÇÃO.....	44
4.9 ANÁLISE DE PRESSÃO DE SELEÇÃO.....	45
5 RESULTADOS.....	46
5.1 FREQUENCIA DE OCORRÊNCIA DE AvRV.....	46
5.2 AMPLIFICAÇÃO DOS 11 SEGMENTOS DE RNA DOS ROTAVÍRUS.....	47
5.3 FILOGENIAS.....	47
5.3.1 ANÁLISE DOS GENES CODIFICADORES DA NSP1-5.....	47
5.3.2 ANÁLISE DOS GENES CODIFICADORES DA VP1-3.....	48
5.3.3 ANÁLISE DOS GENES CODIFICADORES DA VP4, VP6 E VP7.....	49
5.4 CONSTELAÇÕES GENOTÍPICAS.....	61
5.5 ANÁLISES DE RECOMBINAÇÃO.....	61
5.6 ANÁLISES DE PRESSÃO DE SELEÇÃO.....	62
6 DISCUSSÃO.....	64
7 CONCLUSÕES.....	70
REFERÊNCIAS.....	71
ANEXO.....	85
APÊNDICES.....	92

1 INTRODUÇÃO

A produção de carne de frango chegou a 13,1 milhões de toneladas no ano 2015, o que levou o Brasil à posição de segundo maior produtor atrás apenas do EUA. A maior parte desta (67,3%) é destinada ao consumo interno e 32,7% é destinado ao mercado externo. Desta forma, as exportações chegaram ao patamar de 4,3 milhões de toneladas, o que deu ao país o primeiro lugar mundial nas exportações de carne de frango. A importância social da avicultura no Brasil se verifica também pela presença maciça no interior do país, principalmente nos estados do Sul e Sudeste, onde em muitas cidades a produção de frangos é a principal atividade econômica (UBABEF, 2016).

Nesse contexto de aumento de produção e consumo, é crescente a preocupação em relação à sanidade da avicultura brasileira, já que em aves, uma série de bactérias e vírus podem causar doenças, tanto sozinhos quanto em infecções mistas (DAY; ZSAK et al., 2013; KOO et al., 2013). Dentre os agentes virais, os rotavírus (RVs) são importantes patógenos causadores de diarreia, amplamente distribuídos entre seres humanos e várias espécies animais, incluindo mamíferos e aves (ESTES; GREENBERG, 2013).

RV está associado ainda ao crescimento retardado em aves e consequente baixo ganho de peso, motivo pelo qual é considerado um agente com potencial de causar perdas econômicas para a indústria avícola (DHAMA et al. 2009; JINDAL et al. 2012; MALIK et al. 2012; DHAMA et al., 2015).

Tais perdas econômicas são oriundas do impacto na sanidade e desempenho dos lotes devido a mecanismos que permitem a disseminação epidêmica da doença, tal como alojamento de grande número de aves combinado com a elevada concentração de partículas virais na fase aguda da doença, uma vez que a transmissão do rotavírus se dá pela via fecal-oral, podendo ocorrer também através de água e alimentos contaminados (KOOPMANS; DUIZER, 2004; ESTES; KAPIKIAN, 2007).

Levando-se em consideração que existe limitada investigação científica acerca da participação dos rotavírus nas diarreias de aves bem como sua elevada diversidade genética e o potencial de transmissão interespecíes, propõe-se neste estudo caracterizar os genes codificadores das proteínas não

estruturais (NSP1-5) e das proteínas estruturais (VP1-4, VP6-7) em amostras fecais de aves de diferentes criações comerciais, através da técnica de RT-PCR, seguida da determinação das sequências nucleotídicas e realização de inferências filogenéticas, além das análises de recombinação e pressão de seleção em códons. Este estudo propicia um melhor entendimento acerca da epidemiologia e diversidade viral circulante nas criações aviárias brasileiras, servindo de base para o estabelecimento de medidas profiláticas mais eficazes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 HISTÓRICO DOS ROTAVÍRUS

Os rotavírus (RVs) foram descritos pela primeira vez em animais no ano de 1969, quando Mebus et al. (1969) detectaram por meio de microscopia eletrônica a presença de partículas virais de morfologia esférica em amostras fecais diarreicas de bezerros, as quais foram denominadas inicialmente de NCDV (*Nebraska Calf Diarrhea Virus*).

Na década seguinte, diferentes estudos visaram sobretudo a caracterização do agente no que diz respeito a morfologia das partículas por microscopia eletrônica e a associação entre a sintomatologia clínica (diarreias e gastroenterites) e a presença do agente em diferentes espécies animais e em humanos (BISHOP et al., 1973; FLEWETT et al., 1974).

Em 1978, o gênero *Rotavirus* (do latim “rota”, significando “roda”) foi oficialmente reconhecido pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) (MATTHEWS, 1979).

Os rotavírus aviários (AvRV) foram primeiramente observados através de microscopia eletrônica em conteúdo entérico de perus de duas a três semanas de idade, apresentando diarreia aquosa e alta mortalidade na Dakota do Sul, Estados Unidos (BERGERLAND et al., 1977) e posteriormente, também em perus, na Irlanda do Norte em 1978 (McNULTY et al., 1978) e em fezes diarreicas de poedeiras comerciais na Inglaterra (JONES, et al., 1979).

A partir de então, AvRV tem sido descrito em uma variedade de espécies aviárias que incluem frango de corte, pombos, faisão, patos e psitacídeos (GOUGH et al., 1985, 1986; YASON; SCHAT 1985; SAIF et al., 1985; TAKEHARA et al., 1991; MINAMOTO et al., 1988; McNULTY 2003; LEGROTTAGLIE et al., 1997; LUBLIN et al., 2004; DHAMA et al., 2009; MALIK et al., 2013).

No Brasil, rotavírus do grupo A (RVA) foram primeiramente detectados, através das técnicas de PAGE e ELISA, em fezes de frango de corte com diarreia nos estados de Minas Gerais e Paraná (ALFIERI et al., 1989) e posteriormente descritos em amostras fecais de frango de corte, poedeiras e matrizes em

estados das regiões norte, nordeste, centro-oeste, sudeste e sul do país (TAMEHIRO et al., 2003; VILLARREAL et al., 2006; RIOS et al., 2012; SILVA et al., 2013; METTIFOGO et al., 2014; BESERRA et al., 2014a), além de criações comerciais de perus (ASANO et al., 2011; MOURA-ALVAREZ et al., 2014) e em amostras fecais de avestruzes (SILVA et al., 2012) através das técnicas de PAGE, isolamento viral e RT-PCR.

Além dos RVA, rotavírus dos grupos D (RVD), F (RVF) e G (RVG) foram também descritos em aves ao redor do mundo (McNULTY, 2008; TROJNAR et al., 2009; JOHNE et al., 2011; KATOOR et al., 2013; STUCKER et al., 2015; FALCONE et al., 2015). No Brasil, RVD foi primeiramente detectado na região norte (BEZERRA et al., 2012; BEZERRA et al., 2014) e em seguida nos estados de São Paulo, Paraná e Goiás, em amostras de frango de corte, matrizes e poedeiras comerciais sem sintomas de diarreia (BESERRA et al., 2015).

RVF foi primeiramente detectado no país em amostras de frango de corte, sem sintomatologia, nos estados de São Paulo e Paraná (BESERRA et al., 2014b) e mais recentemente em frango de corte no estado do Pará, no qual está também a primeira descrição de RVG no Brasil (MASCARENHAS et al., 2016).

2.2 ESTRUTURA E CLASSIFICAÇÃO

Os RVs pertencem à família *Reoviridae*, subfamília *Sedoreovirinae* e gênero *Rotavirus* (ATTOUI et al., 2012). São partículas de morfologia esférica, simetria icosaédrica, não envelopadas, com diâmetro aproximado de 70nm e constituídas por três camadas proteicas distintas (ESTES; GREENBERG, 2013).

A camada interna do vírus - *core* - é constituída pelas proteínas VP1 (polimerase viral), VP3 (atividade de guanilil transferase) e mais internamente a VP2 (responsável pela ligação do RNA ao interior do *core* e necessária para a atividade de replicase da VP1). O capsídeo intermediário é composto pela VP6 (apresenta funções imunogênicas) e finalmente, o capsídeo externo é formado pelas proteínas VP4 e VP7, que correspondem às espículas da partícula viral e à glicoproteína, respectivamente (ESTES; GREENBERG, 2013).

Os RVs possuem um genoma viral formado por 11 segmentos de RNA fita dupla, no qual cada segmento codifica pelo menos uma proteína, sendo seis

delas estruturais (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 e VP7) e seis não estruturais (NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5/6) (ATTOUI et al., 2012) (Figura 1).

Figura 1 - Representação esquemática da partícula de rotavírus, segmentos genômicos e respectivas proteínas codificadas.

FONTE: Adaptado de ESTES, 2001.

O genoma viral tem em média 18.550 pares de bases e cada segmento do RNA de fita dupla (dsRNA) é dividido em três regiões: uma região 5' não codificadora com uma extremidade guanidina, uma sequência aberta de leitura (ORF, *open reading frame*) e uma região 3' não codificadora com uma extremidade citosina (PATTON; SPENCER, 2000; ESTES, 2001).

Baseado nas propriedades antigênicas e sequências nucleotídicas da proteína VP6, os RVs são classificados em 8 diferentes grupos (RVA-RVH) (MATTHIJNSSENS et al., 2011; ATTOUI et al., 2012). Recentemente, Mihalov-Kóvacs et al. (2015) encontraram evidências de um novo grupo de RV, denominado grupo I, infectando cães na Hungria.

Humanos e animais são acometidos pelos rotavírus dos grupos A, B, C e H (ESTES; GREENBERG, 2013; MARTHALER et al., 2014), enquanto que os grupos D, E, F e G estão descritos apenas em animais (MATTHIJNSSENS et al., 2010). Até o momento, RVA, RVD, RVF e RVG foram detectados em espécies aviárias (JOHNE et al., 2011; MATTHIJNSSENS et al., 2012) e dentre estes,

RVA são os mais prevalentes (ESTES; KAPIKIAN, 2007; McNULTY, 2008; SCHUMANN et al., 2009; OTTO et al., 2012).

Levando em consideração a natureza segmentada dos RVs, um outro sistema de classificação, específico para RVA, foi desenvolvido. Neste, é atribuído um genótipo para cada um dos segmentos virais de acordo com valores de corte para porcentagens de similaridade de nucleotídeos (MATTHIJNSSENS et al., 2008). As proteínas virais VP7-VP4-VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5/6 são descritas utilizando-se as abreviações Gx-P[x]-Ix-Rx-Cx-Mx-Ax-Nx-Tx-Ex-Hx, respectivamente, onde “x” representa um número arábico (MATTHIJNSSENS et al., 2008) (Quadro 1).

Quadro 1 – Definição dos genótipos dos 11 segmentos dos rotavírus baseado nos valores de corte de percentual de similaridade de nucleotídeos

Produto genômico	Valores de corte para porcentagem de similaridade de nt (%)	Genótipos	Origem da designação dos genótipos
VP7	80	G32	G lycosylated
VP4	80	P[46]	P rotease-sensitive
VP6	85	I24	I nter capsid
VP1	83	R18	R NA-dependent
VP2	84	C17	C ore protein
VP3	81	M17	M ethyltransferase
NSP1	79	A28	Interferon A ntagonist
NSP2	85	N17	N TPase
NSP3	85	T19	T ranslation enhance
NSP4	85	E24	E nterotoxin
NSP5	91	H19	pH osphoprotein

FONTE: Adaptado de MATTHIJNSSENS et al. (2008).

A partir desta classificação, estudos de genoma completo foram realizados e pôde-se observar pelo menos três constelações genotípicas predominantes, as quais incluem a maioria das amostras detectadas em humanos e animais: constelação 1 – *Wa-like*: I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1 e constelação 2 – *DS-like*: I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2 (MATTHIJNSSENS et al., 2010), e uma terceira constelação menor – *AU-1-like*: I3-R3-C3-M3-A3-N3-T3-E3-H3, originária de cães e gatos (NAKAGOMI et al., 1989).

Para aves, este tipo de classificação em constelações genotípicas ainda não está descrito e os estudos de genoma completo restringem-se a uma amostra de frango, pombo, peru, faisão e gaivota comum (ITO et al., 2001, TROJNAR et al., 2009, 2013).

No Brasil não existem estudos de genoma completo de AvRV e os dados acerca da diversidade genética dos mesmos é limitada, ficando restrito à caracterização dos genotipos G, P e E (ASANO et al., 2011; SILVA et al., 2011; SILVA et al., 2012; METTIFOGO et al., 2014; BESERRA et al., 2014a).

Foram descritos até o momento, sete genotipos G - G1, G5, G6, G8, G10, G11 e G19 - três genotipos P -P[1], P[7] e P[31] - além de quatro combinações de genotipos G e P: G6P[1], G1P[7], G10P[1] e G19P[31] circulando entre as amostras aviárias brasileiras (ASANO et al., 2011; SILVA et al., 2012; BESERRA et al., 2014a). Está descrito ainda o genotipo E10, detectado em amostras de frango de corte dos estados do Pará e São Paulo (SILVA et al., 2011; METTIFOGO et al., 2014).

2.3 PROTEÍNAS VIRAIS ESTRUTURAIS

A proteína VP1, codificada pelo 1º segmento genômico e localizada no *core* viral, é considerada a maior proteína estrutural do vírus com peso molecular de 125kDa e formada por 1089 aminoácidos, tratando-se de uma RNA polimerase que possui atividades de replicase e transcriptase, catalisando a formação do dsRNA (LU et al., 2008). Esta proteína, no entanto, necessita da VP2 para a atividade de replicação do vírus (HEIMAN et al., 2008).

A VP2, é codificada pelo 2º segmento genômico e é a mais abundante do *core* viral. As proteínas VP1 e VP3 estão ligadas à VP2 que por sua vez circunda o genoma viral (MATTHIJNSSENS et al., 2008). Atua no complexo de replicação viral, transporte de metabólitos e do RNA mensageiro durante a transcrição, além de interagir com a VP6 (McDONALD; PATTON, 2011).

A proteína VP3, codificada pelo 3º segmento genômico, não possui função completamente esclarecida na morfogênese viral, embora estudos apontem sua atividade de guanilil transferase uma vez que esta se liga covalentemente a guanosina trifosfato e provavelmente está envolvida na adição do *cap* presente na extremidade 5' do mRNA viral (HEIMAN et al., 2008), além de se saber que

a interação da VP1/VP2/VP3 é importante na replicação e transcrição do genoma do vírus (OGDEN et al., 2014).

A VP4 é uma proteína não glicosilada, codificada pelo 4º segmento genômico, também conhecida como proteína de espícula e responsável pela ligação do vírus à célula (ESTES, 2001). Possui um sítio de clivagem pela tripsina que quando submetido à ação de proteases gera dois produtos, VP5* e VP8* (ESTES; GREENBERG, 2013). Estes peptídeos aumentam a infectividade do vírus e induzem alterações conformacionais que aumentam a estabilidade da espícula (ATTOUI et al., 2012). 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 (GREENBERG et al., 1983). Também é associado com a restrição da replicação de certas amostras de rotavírus em cultura de células e à indução de anticorpos neutralizantes, o que leva à promoção de uma imunidade protetora (ESTES; KAPIKIAN, 2007). Por outro lado, o peptídeo VP8* contém a maioria dos epítomos associados às reações tipo-específicas localizados em uma região hipervariável (LARRALDE et al., 1991). Em virtude da VP8* conter uma grande diversidade nos sítios de ligação dos anticorpos monoclonais, especulou-se que ela fique localizada mais externamente na partícula viral, o que poderia explicar as regiões de diversidade dessa região (MACKOW et al., 1988).

A VP6, codificada pelo 6º segmento genômico, é uma proteína hidrofóbica e é a mais abundante do vírion, aproximadamente 51%, interagindo com as proteínas VP4 e VP7 e ainda com a VP2 do *core* viral (MATHIEU et al., 2001). É utilizada como principal antígeno na detecção dos rotavírus, devido a presença de antígenos indutores de imunidade e a existência de epítomos conservados entre as diferentes amostras do vírus (ESTES, 2001; ESTES; GREENBERG, 2013).

A glicoproteína VP7, codificada pelo 9º segmento genômico, componente primário do capsídeo externo, é a segunda mais abundante, constituindo cerca de 30% do vírion. Forma a matriz do capsídeo sendo responsável pela indução de anticorpos neutralizantes da partícula viral (MATTION et al., 1994). Possui dois domínios hidrofóbicos chamados de H1 e H2, localizados entre os aminoácidos (aa) 6 - 23 e 33 - 44, respectivamente e funcionando como uma

sequência sinalizadora que orienta a VP7 para a membrana do retículo endoplasmático (GREEN et al., 1988). Reconstruções a partir de microscopia eletrônica têm evidenciado sua estrutura trimérica que forma oligômeros com as proteínas VP4 e NSP4 no interior das células infectadas. Possui sítios de ligação com o cálcio que, ao interagirem com o mesmo, estão envolvidas no processo de montagem da VP7 dentro do capsídeo externo (DORMITZER; GREENBERGER, 1992).

2.4 PROTEÍNAS VIRAIS NÃO ESTRUTURAIS

O genoma viral codifica seis proteínas não estruturais, como dito anteriormente, as quais estão envolvidas nas funções de replicação e morfogênese de novas partículas virais, além de atuarem como enterotoxina viral (ATTOUI et al., 2012; HU et al., 2012).

A NSP1, codificada pelo 5º segmento genômico, é a proteína mais variável dentre todas do genoma viral (ATTOUI et al., 2012), ainda que apresente uma região *zinc-finger* conservada e rica em resíduos de cisteína próxima à região amino-terminal (PATTON, 2000). Seu papel durante a replicação do vírus ainda não está totalmente esclarecido e estudos relatam que esta não é essencial para a replicação em culturas de células (ARNOLD; PATTON, 2011). A proteína é considerada um fator de virulência que atua inibindo a resposta imune inata do hospedeiro suprimindo a indução de morte celular durante os estágios iniciais da infecção (PATTON et al., 2007).

Já NSP2, codificada pelo 8º segmento genômico, tem importante papel na replicação e encapsidação do genoma, através da interação com NSP5 na formação dos viroplasmas (CRIGLAR et al., 2014). Trata-se de uma proteína multifuncional que se liga de forma inespecífica ao ssRNA (RNA fita simples) para início da síntese de dsRNA (RNA fita dupla). Possui adicionalmente as atividades de NTPase, RNA trifosfatase (RTPase) e de nucleosídeo difosfato quinase (KUMAR et al., 2007).

Por sua vez a NSP3, codificada pelo 7º segmento do genoma viral, também é uma proteína multifuncional e se liga especificamente ao terminal 3' dos mRNAs (RNA mensageiro) por meio de sua região amino terminal (ATTOUI et al., 2012) com funções de ligação ao RNA viral e regulação da tradução

(ESTES; KAPIKIAN, 2007). Atua ainda suprimindo a síntese de proteínas do hospedeiro através do seu papel antagonista da proteína de ligação da cauda “poli A” e prevenindo a degradação do mRNA viral por nucleases celulares (CHUNG; McCRAE, 2011).

A NSP4, codificada pelo 10º segmento, é uma glicoproteína transmembrana do retículo endoplasmático com funções na replicação viral e na sua patogênese (ZHANG et al., 1998). Funciona como uma enterotoxina viral (domínio 114 a 135) e induz a diarreia secretora já que supõe-se que a célula infectada secreta NSP4 o que leva a interação com receptores específicos da superfície de outras células não infectadas, evento esse que culmina com a desestabilização da membrana celular, aumento das concentrações intracelular de íons Ca^{2+} e consequente saída de íons Cl^- e de água para o lúmen (PATTON, 2007; KAVANAGH et al., 2010). Atua também como receptor intracelular as partículas com dupla camada recém-formadas e interage com as proteínas do capsídeo viral durante a morfogênese (ZHANG et al., 2000).

Finalmente, as NSP5/6 são codificadas por duas ORF's no mesmo segmento viral (11º). A NSP5 possui atividades de ligação com ssRNA e dsRNA, forma dímeros e é essencial para a formação dos viroplasmas e replicação do genoma viral. Nas células infectadas são encontrados múltiplos isômeros fosforilados de NSP5, modificação essa estimulada pela ligação com a NSP2 e VP2 e mediada por quinase celular e possivelmente por uma atividade de autoquinase da própria NSP5 (MARTIN et al., 2011). O domínio carboxi-terminal da NSP5 é necessário para a hiperfosforilação e interação com a NSP6, proteína de expressão demonstrada apenas em poucas amostras e de função ainda não esclarecida totalmente (HU et al., 2012).

2.5 REPLICAÇÃO

O ciclo de replicação de diversas amostras de rotavírus animal tem sido estudado em células de rim de macaco e acredita-se que ele esteja completo entre 12 a 15 horas a 37°C (ATTOUI et al., 2012). Os estágios iniciais da replicação envolvem a adsorção viral mediada pela proteína VP4 e por seus produtos de clivagem (VP5* e VP8*) aos receptores celulares, dentre os quais estão gangliosídeos e integrina, e posterior entrada na célula. Já foi demonstrado

que a VP7 interage com a superfície celular logo após a ligação das espículas aos receptores (ESTES, 2001).

O vírus entra na célula por endocitose, mediada pelo receptor celular ou por penetração direta pela membrana (ATTOUI et al., 2012). Dentro da célula, a camada externa do vírus é removida levando à liberação de uma DLP (*double layer protein*) transcricionalmente ativa para o citoplasma celular (ARIAS et al., 2004).

A proteína VP1 modula a síntese dos primeiros transcritos de RNA viral que funcionam como mRNA e também de molde para a síntese de dsRNA constituinte da progênie viral. Essa transcrição é denominada assimétrica já que os transcritos são fitas de polaridade positiva que utilizam como molde fitas de sentido negativo dos RNAs genômicos (KAPIKIAN et al., 2001). A síntese de mRNA viral necessita da presença da proteína VP6, visto que esta interage conformacionalmente com a VP1 (CHARPILLENNE et al., 2002).

Durante a replicação uma grande quantidade de proteínas estruturais (VP1, VP2 e VP3) e não estruturais (NSP2 e NSP5) se acumulam resultando em inclusões citoplasmáticas conhecidas como viroplasmas, no interior das quais ocorre a replicação do genoma, síntese do *core* viral e morfogênese de novas partículas virais (ESTES; KAPIKIAN, 2007). Enquanto isso, os demais RNA (+) adentram no *core* recém-formado para servirem de molde para a síntese dos RNA (-), novamente por ação da VP1 como RNA polimerase, levando assim à formação das fitas duplas de RNA no vírion. Em seguida, a VP6 é adicionada ao *core* para formar a segunda camada do capsídeo, resultando numa estrutura de dupla camada semelhante àquela derivada do vírion infectante (KAPIKIAN et al., 2001; CARTER; SAUNDERS, 2007; PATTON et al., 2007).

As partículas de dupla camada deixam os viroplasmas iniciando um brotamento para o interior do retículo endoplasmático mediante a interação dessas partículas com a NSP4, por sua vez sintetizada na membrana desta organela celular tal como a VP7. Assim, durante o brotamento, essas partículas adquirem um envoltório lipídico semelhante a uma vesícula contendo a VP7. No decorrer desse processo a NSP4 se liga também à VP4 e a maturação culmina com a formação do capsídeo externo, remoção do envoltório lipídico e saída do vírion da célula por lise ou exocitose (ARIAS, 2004; PATTON et al., 2007).

2.6 EVOLUÇÃO VIRAL

Os rotavírus são capazes de variar geneticamente através de mecanismos que contribuem para sua adaptação ao hospedeiro (MATTHIJNSSENS et al., 2012), sendo esta diversidade genética necessária para que a pressão de seleção promova o surgimento de variantes com maior *fitness* (aptidão) (SMITH et al., 2009).

Os RVs possuem uma considerada diversidade e dentre os seus diferentes grupos, a identidade de sequências das variadas proteínas é menor que 60% (NAGASHIMA et al., 2008). Dentro do grupo A, são observados elevados níveis de diversidade com alguns genes apresentando-se mais conservados que outros (JIANG et al., 2008).

Até o momento, a diversidade genética dos RVs tem sido atribuída a quatro mecanismos: mutação pontual, *reassortment*, rearranjo e recombinação intragênica (GOSHI; KOBAYASHI, 2011). Dentre estes, a mutação pontual resulta em mudanças na sequência gênica que podem afetar a função das proteínas virais, enquanto que o *reassortment* tem impacto nas constelações genotípicas (GOSHI; KOBAYASHI, 2011).

As mutações pontuais, detectadas por sequenciamento nucleotídico, são ocasionadas pela pressão de seleção entre vírus-hospedeiro (FLORES et al., 1988). Por esse motivo, trata-se de um mecanismo comumente observado nos genes codificadores das proteínas de superfície (VP4 e VP7), por estarem diretamente em contato com os anticorpos neutralizantes (TANIGUCHI; URASAWA, 1995). A seleção natural atua na variação genética de um determinado organismo maximizando a sua adaptabilidade através da eliminação de variantes com mutações deletérias ou da proliferação de variantes com mutações favoráveis (ORR, 2009).

As inferências de pressão de seleção a partir de sequências traduzidas em aminoácidos são baseados na proporção de mutações não sinônimas (dN) e sinônimas (dS), sendo que na primeira ocorre mudança na sequência primária da proteína codificada e na segunda, a sequência permanece inalterada. De acordo com as proporções entre estas mutações, as seleções podem ser do tipo positiva, neutra e negativa (purificadora). Pressão de seleção negativa ocorre quando as mutações são deletérias e as mutações sinônimas aparecem em

proporções maiores que as não sinônimas, desta forma mutações que resultam na geração de partículas virais defectivas, com a perda da função das proteínas, tendem a ser eliminadas da população (KOSAKOVSKY-POND et al., 2009). A seleção neutra é definida quando esta não atua no *fitness* do organismo, logo, as mutações não sinônimas serão fixadas na mesma taxa que as sinônimas. Já a seleção positiva ocorre quando há maior fixação de mutações não sinônimas na população (KOSAKOVSKY-POND et al., 2009)

Alguns dos métodos utilizados na inferência de mutações são: SLAC (*Single Likelihood Ancestor Count*), FEL (*Fixed Effects Likelihood*), IFEL (*Internal Fixed Effects Likelihood*) e REL (*Random Effects Likelihood*) que detectam sítios de aminoácidos sob seleção pelo algoritmo da máxima verossimilhança, o MEME (*Mixed Effects Model of Evolution*) que considera que a distribuição de ω (ω : d_N/d_S) pode variar de sítio para sítio e também de ramo para ramo da árvore em um mesmo sítio, sendo capaz de identificar tanto a seleção pervasiva quanto esporádica. E por fim, o FUBAR (*Fast Unbiased Bayesian Approximation*) que pode detectar seleção positiva sob um modelo mais rápido que os modelos de efeito fixo de máxima verossimilhança, através da indução de um teste rápido que permite visualizar a influência bayesiana de cada local (KOSAKOVSKY-POND et al., 2009).

Reassortment ou *genetic shift* ocorre quando uma mesma célula é infectada por mais de uma partícula viral e a progênie passa a conter genes desses vírus parentais, assim a natureza segmentada do genoma dos RVs permite a troca de um ou mais segmentos durante infecções simultâneas com múltiplas amostras de RV (TANIGUCHI; URASAWA, 1995; MONINI et al., 2014). Este mecanismo é influenciado por diferentes fatores, tais como cepa viral, características do hospedeiro e fatores ambientais (KOBAYASHI et al., 2003).

Os rearranjos representam inserções ou deleções que ocorrem em um único segmento genômico resultando em alteração no tamanho do mesmo e como resultado, alguns segmentos de RNA perdem suas posições usuais e bandas adicionais são visualizadas pela PAGE (MASCARENHAS et al., 2006). Os rearranjos ocorrem provavelmente por uma falha da RNA polimerase no momento da transcrição, contudo, observa-se que os vírus com os segmentos do genoma rearranjados podem não ser defectivos e, portanto, revelam-se geneticamente estáveis (DESSELBERGER, 1996).

A recombinação intragênica consiste na troca de fragmentos entre duas sequências gênicas, no caso, pertencentes a um mesmo genótipo, diferentemente do rearranjo, em que todo o segmento é trocado. Constitui-se em um importante mecanismo para gerar vírus quiméricos capazes de escaparem ao sistema imune do hospedeiro (PARRA et al., 2004). Esta última tem sido descrita como um importante mecanismo de geração de variabilidade e evolução do vírus (PARRA et al., 2004).

As distribuições dos pontos de interrupção (*breakpoints*) de recombinação evidentes dentro de genomas de vírus podem revelar detalhes dos processos mecânicos e bioquímicos subjacentes à recombinação e as forças seletivas que podem vir a restringir a sobrevivência e proliferação de recombinantes (LEFEUVRE et al. 2009; DEDEPSIDIS et al. 2010; SIMON-LORIERE et al. 2010).

Programas computacionais possuem diferentes métodos implementados capazes de detectar recombinações em alinhamentos de sequências do genoma viral (DARREN et al., 2015). Dentre estes, o RDP4 (*Recombination Detection Program*) permite a identificação e caracterização estatística de eventos de recombinação a partir de um conjunto de sequências alinhadas. Utiliza os métodos de recombinação no intuito de identificar *breakpoints* no genoma onde se inicia e termina a recombinação, além das sequências parentais doadoras do fragmento recombinante (DARREN et al., 2015). Outro programa, o GARD (*Genetic Algorithms for Recombination Detection*), utiliza um algoritmo genético de seleção, baseado na verossimilhança para pesquisar, também em alinhamentos de múltiplas sequências, pontos de interrupção no genoma e identificar possíveis sequências recombinantes (KOVAKOSKY-POND et al., 2009).

2.7 DIAGNÓSTICO

Diferentes técnicas de diagnóstico têm sido utilizadas no diagnóstico direto dos rotavírus, como por exemplo, a microscopia eletrônica (THEIL et al., 1986; ATHANASSIOUS et al., 1994) e isolamento viral em cultivo celular (HERRING et al., 1982; YASON; SCHAT, 1985).

Outra técnica de diagnóstico utilizada, a PAGE, é caracterizada pela demonstração dos segmentos genômicos dos RVs em gel de poliacrilamida. Esta técnica tem como vantagem ser sensível e específica para a detecção de diferentes grupos de RV (GUY, 1998), devido ao fato destes possuírem diferentes padrões de migração dos 11 segmentos (SAVITA et al., 2008).

A técnica de ELISA, reação imunoenzimática sensível e específica, também é empregada no diagnóstico de RVA a partir de amostras fecais tanto em mamíferos quanto em aves, entretanto esta técnica não está disponível para o diagnóstico de rotavírus dos grupos D, F e G (KANG et al., 1985; DHAMA et al., 2015).

Levando em consideração a detecção molecular de RVs, a melhor opção tem sido a técnica de RT-PCR, em razão da sua sensibilidade e especificidade além da rápida execução (McNULTY, 2003; TROJNAR et al., 2009, 2010; KATOOR et al., 2014; DHAMA et al., 2015). Variações desta técnica tem sido utilizadas na detecção de RV em aves, dentre elas estão a *multiplex-nested* PCR e a PCR em tempo real (qPCR) (PANTIN-JACKWOOD et al., 2007, 2008; DAY et al., 2007; JINDAL et al., 2012; DAY; ZAK, 2013).

2.8 PREVENÇÃO E CONTROLE

Em veterinária, vacinas inativas e atenuadas para a prevenção de rotavirose em bezerros, leitões e potros são administradas via parenteral às mães no estágio final da gestação com o objetivo de gerar imunidade passiva aos filhotes através do colostro e aleitamento (MARTELLA et al., 2010). No entanto, vacinas contra AvRV ainda não estão disponíveis no mercado, desta forma, são necessárias medidas estritas de biossegurança com o objetivo de prevenir e/ou controlar a disseminação dos RV em lotes aviários (ATTOUI et al., 2012).

Estão entre estas medidas estão a frequente troca da cama dos aviários, já que a reutilização desta é considerada uma importante causa da manutenção dos RVs em lotes subsequentes, limpeza e desinfecção de equipamentos antes da introdução de um novo lote de aves, além do manejo *all in all out*, vazio sanitário e fornecimento de água de qualidade (DHAMA et al., 2015).

Deve-se ainda fazer o controle de infecções secundárias, causadas por bactérias, com o uso de medicação antimicrobiana. Para minimizar a desidratação, oriunda das diarreias causadas por infecções por RV, é recomendado o uso de soluções de eletrólitos na água de bebida das aves durante os estágios agudos da doença (McNULTY, 2003).

3 OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo são:

- a) Pesquisar a frequência de ocorrência de rotavírus do grupo A em amostras fecais de aves provenientes de criações comerciais de frango de corte, poedeiras, matrizes e avós localizadas em diferentes estados brasileiros.
- b) Caracterizar os 11 segmentos de RNA de rotavírus codificadores das proteínas não estruturais (NSP1-NSP5) e estruturais (VP1-VP3, VP4, VP6 e VP7) presentes em amostras fecais aviárias positivas para RVA através de RT-PCR e reação de sequenciamento nucleotídico.
- c) Investigar a diversidade genotípica encontrada através de análises filogenéticas.
- d) Analisar a ocorrência de recombinações genéticas e pressão de seleção em códons nas amostras caracterizadas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 FLUXOGRAMA DE TRABALHO

A sequência de atividades desenvolvidas neste estudo, está esquematicamente apresentada a seguir (Figura 2).

FONTE: (BESERRA, 2017)

4.2 AMOSTRAS

Foram utilizadas amostras fecais de aves (226 amostras) oriundas de criações de frangos de corte, poedeiras, matrizes e avozeiros de diferentes estados brasileiros (São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Minas Gerais, Espírito Santo, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Bahia, Pernambuco e Ceará).

Parte das amostras (111) já se encontravam armazenadas a -80°C no Laboratório de Biologia Molecular Aplicada e Sorologia - VPS - FMVZ - USP, previamente utilizadas em estudo envolvendo a caracterização dos genes codificadores das proteínas estruturais VP4 e VP7 em estudo realizado

anteriormente (BESERRA et al., 2014a). Além disso, foram utilizadas novas amostras (115) recebidas no mesmo laboratório, entre os anos de 2014 a 2016.

As amostras fecais foram diluídas em água ultrapura, em proporção de 50% (p/v) e clarificadas por centrifugação a 12.000 g por 15 minutos a 4°C, sendo o sobrenadante utilizado nas reações de extração do RNA (item 4.3).

4.3 EXTRAÇÃO DO RNA DE ROTAVÍRUS AVIÁRIO

Todas as amostras foram submetidas à reação de RT-PCR, para a triagem inicial e em seguida, caso positivas, para a caracterização genética. Para isso, foram feitas extrações do RNA utilizando-se o reagente TRizol (Invitrogen®) de acordo com as instruções do fabricante.

O RNA extraído foi ressuspensionado em 15µL de água previamente tratada com DEPC (dietilpirocarbonato) e mantido a -20°C até seu processamento nas demais etapas.

4.4 REAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO REVERSA (RT) E PCR

A partir do RNA extraído (item 4.3), as amostras foram submetidas à reação de transcrição reversa utilizando-se *primers* randômicos (Invitrogen®), de acordo com o protocolo a seguir:

- Misturar 7 µL da amostra de RNA extraído à solução “RT-mix”, que por sua vez é composta por 4 µL de *First Strand Buffer* (Invitrogen®), 2 µL de solução de dNTP a 10 mM, 2 µL de DTT (100mM), 1µL de *Random primers* (50 ng/µL - Invitrogen®), 3 µL de água e 200 U *M-MLV Reverse Transcriptase* (Invitrogen®) para um volume final de reação de 20 µL; incubando-a a seguir por 37°C/50 minutos e 70°C/15 minutos.

Em seguida, como etapa inicial de triagem, as amostras foram submetidas paralelamente a duas reações de PCR visando à amplificação dos genes codificadores das proteínas NSP5 e VP6.

A triagem das amostras tendo como alvo a NSP5 foi feita através de uma reação de *nested*-PCR, com *primers* e condições de amplificação descritos por

Salem et al. (2010). Já a triagem da VP6 foi realizada com *primers* desenvolvidos neste estudo (Quadro 2).

Realizadas as reações de triagem, 5µL dos produtos foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% (p/v) em tampão TRIS-borato 0,045 M; EDTA 0,001 M pH 8,0; fazendo-se corar o gel através da aplicação de *SYBR Safe DNA gel stain* (Invitrogen®), de acordo com instruções do fabricante.

Foram consideradas positivas, as amostras que apresentaram no gel segmentos amplificados de tamanho igual a 208 e 823 pares de base (pb), respectivamente para NSP5 e VP6, tendo como referência a inclusão de DNA ladder 100 bp (Invitrogen®).

As amostras consideradas positivas tiveram os genes NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5, VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 e VP7 amplificados. Para estas reações, foi utilizado o seguinte protocolo de PCR, onde para cada gene foram empregados diferentes pares de *primers* (Quadro 2) e ciclos (Quadro 3):

- Acrescentar 2,5 µL de cDNA (oriundo da reação de RT-item 4.3) à solução PCR-mix, que por sua vez é composta por 1x PCR Buffer (Invitrogen®), 0,2 mM de cada dNTP, 0,5 µM de cada *primer* (senso e antissenso), 2 mM de MgCl₂, 1,25 U de taq DNA Polymerase (Invitrogen®) e água tratada com DEPC q.s.p 25 µL.

Quadro 2 – Descrição dos *primers*, respectivas sequências e tamanhos dos produtos (pb), desenhados e de literatura, utilizados no estudo – São Paulo – 2017

Gene	Primer	Sequência (5'→3')	Produto (pb)	Posição no genoma	Referência
NSP1	NSP1AVF	AACAGTGRTGTTGGTGAGACG	656	16-36	Desenhados no estudo
	NSP1AVR	CTCTCTATTTCTCTGMGGYTC		651-671	
	NSP1F645	CATTATGARCKCAGAGAAATAG	690	645	
	NSP1R1334	TGTAGTAATRTCAGCRCAGCG		1314-1334	
NSP2	NSP2AVF	GTCGTTATGGCYGAGCTAGC	677	40-60	
	NSP2AVR	TGBCCTTTRCCATGWGTAAT		697-716	
	NSP2F656	TAGTWGCTGARTTRAGRTGG	384	656-675	
	NSP2R1039	ACATAAAGSGCTTTCAATTC		1020-1039	
NSP3	NSP3AVF	TTTAAAGTCACATCGAGGCA	1064	5-24	
	NSP3AVR	ACGRTTTTAACATCAAGTTAGC		1047-1068	
NSP4	NSP4AVF	GGAAAGATGGAGAACGYAC	623	35-54	
	NSP4AVR	GKCTTCWTGMCACACCCGAT		637-657	
NSP5*	P1	GGCTTTTAAAGCGCTACAGTGATGTCTCT	317	1-29	SALEM et al., 2010
	P2	GGTCGTGATTGTGTTGATGAATCCATAGA		289-317	
	P3	CTCAGCATTGACGTAACGAGTCTTCC	208	28-53	
	P4	TGAGTGGATCGTTTGAAGCAGAATCAGA		208-253	
NSP5**	GEN-NSP5F	GGCTTTTAAAGCGCTACAG	664	1-19	MATTHIJNSSENS et al., 2008
	GEN-NSP5R	GGTCACAAAACGGGAGT		648-664	
VP1	VP1AVF	GCTATACGATGGGGACG	769	11-27	Desenhados no estudo
	VP1AVR	GCRACAAAATTGACATTGGTGA		757-779	
	VP1F565	GTTCCAAGACATGATCAAAA	979	565-585	
	VP1R1543	GHGTWACRTCACCATATGA		1525-1543	
VP2	VP2AVF	GGCTATWAAAGCTCAASATG	754	1-20	
	VP2AVR	TCGGCAATGAATCTYCTAA		736-754	
	VP2F714	GATGARGAACTGARGGTGT	954	714-733	
	VP2R1667	TCTTTGCACCGAACCTTCT		1650-1667	
VP3	VP3AVF	TAGTRCGTCTTACTCTTAGTGG	764	21-42	
	VP3AVR	GYTCCAAYCCACTTCTCTTG		767-786	
	VP3F713	ATAAYGAATTATGCAGCYAATG	743	713-734	
	VP3R1455	TTATCYCTRCTCATTATTYTCATT		1433-1455	
VP4	CON3	TGGCTTCGCTCATTTATAGACA	876	11-32	GOUVEA et al., 1994
	CON2	ATTTTCGGACCATTATAACC		868-887	
VP6	VP6AVF	ATGGATGTGCTTTATTCCT	823	25-44	Desenhados no estudo
	VP6AVR	CTTGRTAATTAGTTATTACTTG		826-847	
	VP6F727	AGAGCRGTTATWCCAACAGCYG	623	727-748	
	VP6R1349	GGTCACATCCTCTCACTATACTG		1327-1349	
VP7	VP7AVEFW	TGTATAGTACTGARTGTACTATCCTT	888	3-28	BESERRA et al., 2014
	VP7ANYRW	TGCCACCAYYTYTTCC		876-891	

FONTE: (BESERRA, 2017)

*Par de *primers* utilizados na triagem de todas as amostras

**Par de *primers* utilizados na amplificação/reação de sequenciamento

Por fim, 5 µL dos produtos oriundos das reações foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% (p/v) em tampão TRIS-borato 0,045 M; EDTA 0,001 M pH 8,0, fazendo-se corar o gel através da aplicação de SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen®), de acordo com instruções do fabricante.

Quadro 3 – Tempo e temperaturas de amplificação dos genes estudados – São Paulo – 2017

Gene	Programa
NSP1-4/VP1-3/VP6	94°C/3 min – 10 ciclos (94°C/45 seg; 45 a 50°C/30 seg (+0,5°C/ciclo); 72°C/45 seg), 30 ciclos (94°C/45 seg; 50°C/30 seg; 72°C/45 seg) – 72°C/10min
NSP5*	94°C/4 min – 40 ciclos (94°C/1 min; 60°C/1 min; 72°C/1 min) – 72°C/5min
NSP5**	94°C/3 min – 40 ciclos (94°C/45 seg; 45°C/45 seg; 72°C/2,5min) – 72°C/7min
VP4	94°C/90 seg – 30 ciclos (94°C/1 min; 40°C/2 min; 72°C/1 min) – 72°C/10min
VP7	94°C/3 min – 30 ciclos (94°C/45 seg; 50°C/30 seg; 72°C/45 seg) – 72°C/10min

FONTE: (BESERRA, 2017)

*SALEM et al. (2010).

**MATTHIJNSSENS et al. (2008).

Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram ao gel segmentos amplificados de tamanhos previstos (Quadro 2), tendo como referência a inclusão de DNA ladder 100 bp (Invitrogen®) ou 1 kb (Invitrogen®).

Os pares de *primers* sintetizados neste estudo, contemplam especificamente a diversidade genotípica aviária. Para isto, foram importadas sequências nucleotídicas, de cada gene alvo, disponíveis no *Genbank* utilizando-se o programa Bioedit 7.2.5 (HALL, 1999), de modo a se realizar o alinhamento das mesmas, mediante o uso do software ClustalW 2.1 (LARKIN et al., 2007).

A seleção dos oligonucleotídeos foi feita manualmente/visualmente, levando-se em consideração os parâmetros de temperatura de anelamento (T_m); teor (%) de GC; análise de *hairpins*, dímeros (*self-dimer* e *cross-dimer*), sequências palíndromas e repetições de um mesmo nucleotídeo (*runs*), avaliados pelo aplicativo Netprimer (© 2013 PREMIER Biosoft).

4.5 REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO NUCLEOTÍDICO

Os produtos de PCR foram submetidos à reação de sequenciamento nucleotídico do tipo Sanger. Para tanto, os mesmos foram inicialmente purificados diretamente do gel de agarose, quando observadas bandas além daquelas específicas, com o *kit Purelink Quick Gel Extraction* (Invitrogen®). Em casos de banda única, utilizou-se o reagente *ExoSap-it* (USB®), de acordo com instruções dos fabricantes, em ambos os casos.

Após esta etapa, os produtos foram submetidos a reações de sequenciamento bidirecional, pipetando-se a cada um dos tubos, 2 µL do

reagente Big-Dye 3.1 (Applied Biosystems™), 1,5 µL de tampão de sequenciamento, 5 µM de cada primer senso ou antissenso e 6,0 µL do DNA alvo para uma reação final com volume de 10 µL, sendo submetidos a 40 ciclos de 96°C por 1 minuto, 50°C por 15 segundos, 60°C por 4 minutos, com rampa de 1°C por segundo em todas as etapas.

Em seguida utilizou-se o reagente BigDye XTerminator™, com o objetivo de remover terminadores não incorporados ao DNA, segundo instruções do fabricante. As amostras foram então submetidas ao sequenciador automático de DNA ABI-3500 (Applied Biosystems™), também de acordo com instruções do fabricante.

4.6 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS

As sequências nucleotídicas geradas foram visualizadas através do aplicativo FinchTv v. 1.4.0 (© 2011, Geospiza) e aquelas oriundas dos *primers* antissenso foram transformadas para o seu reverso e complemento pelo mesmo aplicativo. Em seguida, feita a importação das sequências para o formato FASTA, utilizando-se o software Bioedit v. 7.2.5 (HALL, 1999).

Foram verificadas as consistências dos achados através do serviço *Blast-n* do *GenBank*, e a partir deste último, importadas as diversas sequências descritas das regiões alvo amplificadas, junto ao programa Bioedit v. 7.2.5 (HALL, 1999), de modo a se realizar a edição e alinhamento entre as recém obtidas com aquelas já descritas, mediante o uso do software ClustalW v. 2.1 (LARKIN et al., 2007).

Para a caracterização dos genotipos de RVA aviários, foi utilizado, além das árvores filogenéticas (item 4.7), o software RotaC 2.0 (MAES et al., 2009), uma ferramenta utilizada na diferenciação rápida de genotipos de todos os 11 segmentos de RVA.

4.7 ANÁLISE FILOGENÉTICA

As relações filogenéticas para cada um dos genes de rotavírus pesquisados (NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5/6, VP1, VP2, VP3 e VP6) foram

feitas inicialmente através do cálculo da matriz de identidade de nucleotídeos utilizando-se o software BioEdit v. 7.2.5 (HALL, 1999).

A inferência filogenética dos rotavírus foi realizada mediante uso do programa MEGA versão 7 (KUMAR et al., 2015), visando situar as amostras de acordo com os seus respectivos genótipos e relações epidemiológicas entre os achados.

As árvores geradas a partir das sequências nucleotídicas foram construídas com o método de *maximum likelihood* e os modelos de substituição foram definidos para cada gene através do *Bayesian Information Criterion* (BIC), disponível no software MEGA. Os modelos definidos foram (gene/modelo): NSP1-3, VP1-3, VP4, VP6, VP7/GTR e NSP4, NSP5/HKY. Foram ainda definidos os valores de *bootstrap* a partir de 1.000 repetições, cujos valores acima de 70 apresentam-se juntos aos nós das árvores apresentadas.

4.8 ANÁLISE DE RECOMBINAÇÃO

Com o objetivo de identificar possíveis eventos de recombinação foram realizadas análises, para cada um dos 11 genes estudados, entre as amostras aviárias aqui geradas e as demais importadas do *Genbank* utilizadas para a construção das árvores. Para tal, foram excluídas das análises sequências repetidas, através do software *Duplicates Finder v.1.1*, além das sequências recombinantes (previamente conhecidas).

Os alinhamentos das sequências de cada gene foram analisados utilizando-se os métodos *RDP* (MARTIN; RYBICKI, 2000); *GENECOV* (PADIDAM et al., 1999); *Chimaera* (POSADA; CRANDALL, 2001); *MaxChi* (MAYNARD SMITH, 1992); *Bootscan* (SALMINEN et al., 1995); *SisCan* (GIBBS et al., 2000); *3seq* (BONI et al., 2007) e *LARD* (HOLMES et al., 1999), disponíveis no programa *Recombination Detection Program v.4* (RDP4) (MARTIN et al., 2015); além do programa *GARD* (*Genetic Algorithms for Recombination Detection*) (KOSAKOVSKY POND et al., 2006) disponível no pacote HyPhy do servidor Datamonkey <<http://www.datamonkey.org>>, utilizando o limiar de detecção padrão.

Foram consideradas recombinantes as amostras que apresentaram eventos de recombinação na mesma região do alinhamento detectada pelo

GARD e em pelo menos três métodos disponíveis no programa RDP4, sendo considerados valores de $p < 0,05$.

4.9 ANÁLISE DE PRESSÃO DE SELEÇÃO

Foram feitas análises de pressão de seleção também em todos os 11 segmentos dos RVA. As regiões recombinantes foram removidas, através do programa RDP4, naqueles genes em que foram observados eventos de recombinação para posterior análise de pressão de seleção. Para esta análise foram utilizadas as mesmas sequências utilizadas nos itens 4.7 e 4.8.

A pressão de seleção foi avaliada para cada sítio de aminoácido individualmente pela taxa número de substituições não sinônimas e sinônimas (d_N/d_S) utilizando os métodos SLAC (*Single Likelihood Ancestor Count*), FEL (*Fixed Effects Likelihood*), IFEL (*Internal Fixed Effects Likelihood*), REL (*Random Effects Likelihood*), MEME (*Mixed Effects Model of Evolution*), e FUBAR (*Fast Unbiased Bayesian Approximation*) (KOSAKOVSKY POND; FROST 2005), disponíveis no servidor Datamonkey <<http://www.datamonkey.org>>. Foram considerados pressão de seleção positiva aqueles sítios detectados por pelo menos três dos métodos citados acima.

O modelo de substituição nucleotídica HKY85 (HASEGAWA, KISHINO; YANO, 1985) e valor de $p < 0,1$ foi adotado para SLAC, FEL, IFEL e MEME; para FUBAR uma probabilidade a posteriori $> 0,9$; e para REL, adotou-se o fator de Bayes igual a 50, modelo HKY85, de acordo com sugestões do programa.

5 RESULTADOS

5.1 FREQUÊNCIA DE OCORRÊNCIA DE AvRV

Das 226 amostras fecais analisadas, 41 (41/226; 18,14%) foram positivas visando à amplificação da NSP5, sendo que destas, 20 são provenientes de frango de corte (48,78%), 9 de matrizes (21,95%), 8 de aves de postura (19,51%), 1 de avozeiro (2,43%) e originários dos estados de São Paulo (23/41; 56,09%), Paraná (6/41; 14,63%), Santa Catarina (4/41; 9,75%), Rio Grande do Sul (4/41; 9,75%) e Goiás (1/41; 2,43%). Em três amostras (3/41; 7,31%), não foi possível identificar o tipo de criação e o estado de origem, uma vez que as amostras foram recebidas no laboratório e nestes casos, os dados de origem não estavam preenchidos. A lista completa das amostras analisadas neste estudo está apresentada no anexo A.

Com relação ao gene codificador da VP6, das 226 amostras fecais analisadas, 22 (22/226; 9,73%) foram consideradas positivas, sendo que destas, 14 são provenientes de frangos de corte (63,63%), 1 de matriz (4,54%), 1 de ave de postura (4,54%) e originárias dos estados de São Paulo (3/22; 13,63%), Paraná (10/22; 45,45%), Rio Grande do Sul (2/22; 9,09%) e Pernambuco (1/22; 4,54%). Em seis amostras (6/22; 27,27%), não foi possível identificar o tipo de criação e o estado de origem.

Apenas quatro amostras (4/226; 1,76%), apresentaram resultados positivos nos dois genes, NSP5 e VP6, utilizados na triagem deste estudo (Tabela 1).

Tabela 1 - Concordância entre os resultados das reações de PCR visando a amplificação dos genes codificadores das proteínas VP6 e NSP5 - São Paulo - 2017

VP6	NSP5		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	4	18	22
Negativo	37	167	204
Total	41	185	226

FONTE: (BESERRA, 2017)

5.2 AMPLIFICAÇÃO DOS 11 SEGMENTOS DE RNA DOS ROTAVÍRUS

Do total de amostras positivas (item 5.1), foi possível obter amplificação dos 11 genes dos RVA em 10. Dentre estas, 7 (7/10; 70%) são originárias de criações de frango de corte, 1 de ave de postura (1/10; 10%) e provenientes dos estados do Paraná (4/10; 40%), São Paulo (2/10; 20%), Rio Grande do Sul (1/10; 10%) e Pernambuco (1/10; 10%). Em duas amostras (2/10; 20%) não foi possível determinar o tipo de criação e o estado de origem.

As 10 amostras cujos 11 segmentos foram amplificados, estão apresentadas no quadro 5. As sequências originárias destas amostras foram depositadas no *Genbank* e seus respectivos números de acesso estão apresentados no apêndice A.

5.3 FILOGENIAS

Todos os genótipos definidos através das filogenias foram consistentes com aqueles definidos nas análises junto ao programa RotaC. As similaridades apresentadas nos tópicos 5.3.1, 5.3.2 e 5.3.3 referem-se a identidade em termos de nucleotídeos entre as amostras aqui caracterizadas e aquelas, também pertencentes a aves, disponíveis no *Genbank*.

5.3.1 ANÁLISE DOS GENES CODIFICADORES DA NSP1-5

A análise filogenética parcial do gene codificador da NSP1 (1130 nucleotídeos, 76,14%) demonstrou a ocorrência do genótipo A16 em todas as 10 amostras caracterizadas neste estudo (Figura 3). Dois sub clados foram observados, um compreendendo os genótipos A4 e A16 e outro contendo os genótipos A24 e A21. As amostras deste estudo demonstraram, no geral, uma elevada diversidade genética dentro do genótipo A16 (86,9-90%) (Apêndice B).

No que diz respeito ao gene codificador da NSP2, uma análise da parcial da ORF (897 nt/ 94,42%) revelou a existência de dois genótipos, N4 e N6 (Figura 4), entre as amostras brasileiras. Nove amostras deste estudo apresentaram maior relação, umas com as outras (93,8-98,5%) e com a amostra RVA/Chicken-

tc/DEU/02V0002G3/2002/G19P[30] (Apêndice D), pertencente ao genótipo N6 e uma amostra, genótipo N4, apresentou maior similaridade com a amostra de peru RVA/Turkey-tc/GER/03V0002E10/2003/G22P[35] (Figura 4, Apêndice C).

Com relação ao gene codificador da NSP3, uma análise parcial da ORF (835 nt/ 88,45%), demonstrou que a maioria das amostras aqui definidas (9/10), apresentou o genótipo T8, enquanto que uma foi classificada como pertencente ao genótipo T4 (Figura 5). Dentro do genótipo T8, as amostras foram mais relacionadas umas com as outras (91,5-100%) e com a amostra RVA/Chicken-tc/IRL/Ch-1/1979/G19P[30] (91,8%) (Apêndice F). Enquanto que a amostra pertencente ao genótipo T4, guardou maior relação com a amostra de peru RVA/Turkey-tc/GER/03V0002E10/2003/G22P[35] (Apêndice E).

Análise parcial do gene codificador da NSP4 (513 nt/ 97,1%) revelou que nove amostras se agruparam junto ao genótipo E10 (Figura 6). As amostras brasileiras 1, 7, 65, 103, 117, 121 e 198 demonstraram, no geral, um baixo nível de diversidade dentro do genótipo E10 (98-100%) e foram mais similares a amostra RVA/Chicken-wt/BRA/AVE-65/2009 (96,5%) (Apêndice H), descrita anteriormente no Brasil (SILVA et al., 2013). A amostra brasileira pertencente ao genótipo E4 foi mais relacionada a amostra de peru RVA/Turkey-tc/IRL/Ty-1/1979/G17P[38] (96,1%) (Apêndice G).

Similarmente, a análise filogenética da ORF completa do gene codificador da NSP5, demonstrou uma baixa diversidade genética entre as nove amostras pertencentes ao genótipo H8 (Figura 7) e estas foram mais relacionadas a amostra RVA/Chicken-tc/DEU/02V0002G3/2002/G19P[30] (100%) (Apêndice J). A outra amostra brasileira aqui definida, apresentou maior similaridade com a amostra de peru RVA/Turkey-tc/GER/03V0002E10/2003/G22P[35] (96,8%) (Apêndice I) e agrupou-se no genótipo H4.

5.3.2 ANÁLISE DOS GENES CODIFICADORES DA VP1-3

A análise filogenética parcial do gene codificador da VP1 (1427 nt/ 43,7%), revelou a existência de dois genótipos circulando entre as amostras brasileiras, R4 e R6 (Figura 8). As nove amostras pertencentes ao genótipo R6 são altamente relacionadas umas com as outras (93-99%) e com a amostra RVA/Chicken-tc/IRL/Ch-1/1979/G19P[30] (91%) (Apêndice L) e aquela

pertencente ao genótipo R4, está mais relacionada à amostra de peru RVA/Turkey-tc/IRL/Ty-1/1979/G17P[38] (93,8%) (Apêndice K).

Com relação à análise do gene codificador da VP2 (761 nt/ 28,8%), as amostras brasileiras agruparam-se nos genótipos C6 (9/10) e C4 (1/10) (Figura 9). Aquelas pertencentes ao genótipo C6, apresentaram maior similaridade entre si (82,9-100%) e com a amostra RVA/Chicken-tc/IRL/Ch-1/1979/G19P[30] (92,4%) (Apêndice N). A amostra caracterizada como genótipo C4, foi mais similar a amostra de peru RVA/Turkey-tc/IRL/Ty-1/1979/G17P[38] (96,1%) (Apêndice M).

No que diz respeito a análise parcial do gene codificador da VP3 (1340 nt/ 53,51%), nove amostras agruparam-se no genótipo M7 (Figura 9) e foram mais relacionadas a amostra RVA/Chicken-tc/DEU/02V0002G3/2002/G19P[30] (89,4%) (Apêndice P), enquanto que uma amostra foi definida como genótipo M4 e apresentou maior similaridade com a amostra aviária RVA/Avian/UK/CH2/2003 (96,3%) (Apêndice O).

5.3.3 ANÁLISE DOS GENES CODIFICADORES DA VP4, VP6 e VP7

A análise parcial do gene codificador da VP4 (633 nt/ 28,42%), demonstrou que todas as amostras do estudo pertencem ao genótipo P[31] (Figura 11). Estas amostras estão altamente relacionadas umas com as outras (80,3-100%) e são mais similares à amostra RVA/Chicken-tc/DEU/06V0661/2006/G19P[31] (89,3%) (Apêndice Q).

Já a análise parcial do gene codificador da VP6 (1128 nt/ 94,78%), revelou os genótipos I11 (9/10) e I6 (1/10) nas amostras deste estudo (Figura 12). As nove amostras são altamente relacionadas umas com as outras (94,1%-100%) e mais similares à RVA/Chicken/KOR/AvRV-2/2011/G19P[30] (94,3%) (Apêndice S). A outra amostra aqui definida, apresenta maior similaridade com a amostra de peru RVA/Turkey/GER/Ty-3/2005 (97,9%) (Apêndice R)

Finalmente, a análise parcial do gene codificador da VP7 (706 nt/ 72,26%), demonstrou que todas as amostras brasileiras pertencem ao genótipo G19 (Figura 13). As amostras deste estudo são mais similares à RVA/Chicken-tc/IRL/Ch-1/1979/G19P[30] (95,5%), e altamente relacionadas umas com as outras (90,9%-100%) (Apêndice T).

Figura 3 – Árvore filogenética construída com o critério de *maximum likelihood* baseada na região parcial do gene codificador da NSP1 dos RVAs. As amostras apresentam a identificação RVA/hospedeiro/país/amostra/ano/genótipo G e P. Os números próximos a cada nó representam os valores de *bootstrap* (1.000 repetições) e a escala representa o número de substituições/sítio. Os triângulos representam as sequências aqui definidas - São Paulo - 2017

Figura 4 – Árvore filogenética construída com o critério de *maximum likelihood* baseada na região parcial do gene codificador da NSP2 dos RVAs. As amostras apresentam a identificação RVA/hospedeiro/país/amostra/ano/genótipo G e P. Os números próximos a cada nó representam os valores de *bootstrap* (1.000 repetições) e a escala representa o número de substituições/sítio. Os triângulos representam as sequências aqui definidas - São Paulo - 2017

Figura 5 – Árvore filogenética construída com o critério de *maximum likelihood* baseada na região parcial do gene codificador da NSP3 dos RVAs. As amostras apresentam a identificação RVA/hospedeiro/país/amostra/ano/genótipo G e P. Os números próximos a cada nó representam os valores de *bootstrap* (1.000 repetições) e a escala representa o número de substituições/sítio. Os triângulos representam as sequências aqui definidas - São Paulo - 2017

Figura 6 – Árvore filogenética construída com o critério de *maximum likelihood* baseada na região parcial do gene codificador da NSP4 dos RVAs. As amostras apresentam a identificação RVA/hospedeiro/país/amostra/ano/genótipo G e P. Os números próximos a cada nó representam os valores de *bootstrap* (1.000 repetições) e a escala representa o número de substituições/sítio. Os triângulos representam as sequências aqui definidas - São Paulo - 2017

Figura 7 – Árvore filogenética construída com o critério de *maximum likelihood* baseada na região parcial do gene codificador da NSP5 dos RVAs. As amostras apresentam a identificação RVA/hospedeiro/país/amostra/ano/genótipo G e P. Os números próximos a cada nó representam os valores de *bootstrap* (1.000 repetições) e a escala representa o número de substituições/sítio. Os triângulos representam as sequências aqui definidas - São Paulo - 2017

Figura 8 – Árvore filogenética construída com o critério de *maximum likelihood* baseada na região parcial do gene codificador da VP1 dos RVAs. As amostras apresentam a identificação RVA/hospedeiro/país/amostra/ano/genótipo G e P. Os números próximos a cada nó representam os valores de *bootstrap* (1.000 repetições) e a escala representa o número de substituições/sítio. Os triângulos representam as sequências aqui definidas - São Paulo - 2017

Figura 9 – Árvore filogenética construída com o critério de *maximum likelihood* baseada na região parcial do gene codificador da VP2 dos RVAs. As amostras apresentam a identificação RVA/hospedeiro/país/amostra/ano/genótipo G e P. Os números próximos a cada nó representam os valores de *bootstrap* (1.000 repetições) e a escala representa o número de substituições/sítio. Os triângulos representam as sequências aqui definidas - São Paulo - 2017

Figura 10 – Árvore filogenética construída com o critério de *maximum likelihood* baseada na região parcial do gene codificador da VP3 dos RVAs. As amostras apresentam a identificação RVA/hospedeiro/país/amostra/ano/genótipo G e P. Os números próximos a cada nó representam os valores de *bootstrap* (1.000 repetições) e a escala representa o número de substituições/sítio. Os triângulos representam as sequências aqui definidas - São Paulo - 2017

Figura 11 – Árvore filogenética construída com o critério de *maximum likelihood* baseada na região parcial do gene codificador da VP4 dos RVAs. As amostras apresentam a identificação RVA/hospedeiro/país/amostra/ano/genótipo G e P. Os números próximos a cada nó representam os valores de *bootstrap* (1.000 repetições) e a escala representa o número de substituições/sítio. Os triângulos representam as sequências aqui definidas - São Paulo – 2017

Figura 12 – Árvore filogenética construída com o critério de *maximum likelihood* baseada na região parcial do gene codificador da VP6 dos RVAs. As amostras apresentam a identificação RVA/hospedeiro/país/amostra/ano/genótipo G e P. Os números próximos a cada nó representam os valores de *bootstrap* (1.000 repetições) e a escala representa o número de substituições/sítio. Os triângulos representam as sequências aqui definidas - São Paulo – 2017

Figura 13 – Árvore filogenética construída com o critério de *maximum likelihood* baseada na região parcial do gene codificador da VP7 dos RVAs. As amostras apresentam a identificação RVA/hospedeiro/país/amostra/ano/genótipo G e P. Os números próximos a cada nó representam os valores de *bootstrap* (1.000 repetições) e a escala representa o número de substituições/sítio. Os triângulos representam as sequências aqui definidas - São Paulo - 2017

5.4 CONSTELAÇÕES GENOTÍPICAS

Foram definidas duas constelações genotípicas distintas para as 10 amostras sequenciadas de cada um dos 11 segmentos dos rotavírus, sendo elas: G19-P[31]-I11-R6-C6-M7-A16-N6-T8-E10-H8 e G19-P[31]-I4-R4-C4-M4-A16-N4-T4-E4-H4 (Quadro 4). A amostra 42, única com genotipo diferente das demais, é originária de criação de frango de corte do estado de São Paulo. Todas as amostras do estudo agruparam-se em genotipos tipicamente aviários.

Quadro 4 – Identificação das amostras e constelações de genotipos definidos no estudo – São Paulo – 2017

ID	VP7	VP4	VP6	VP1	VP2	VP3	NSP1	NSP2	NSP3	NSP4	NSP5
1	G19	P[31]	I11	R6	C6	M7	A16	N6	T8	E10	H8
7	G19	P[31]	I11	R6	C6	M7	A16	N6	T8	E10	H8
22	G19	P[31]	I11	R6	C6	M7	A16	N6	T8	E10	H8
28	G19	P[31]	I11	R6	C6	M7	A16	N6	T8	E10	H8
42	G19	P[31]	I4	R4	C4	M4	A16	N4	T4	E4	H4
65	G19	P[31]	I11	R6	C6	M7	A16	N6	T8	E10	H8
103	G19	P[31]	I11	R6	C6	M7	A16	N6	T8	E10	H8
117	G19	P[31]	I11	R6	C6	M7	A16	N6	T8	E10	H8
121	G19	P[31]	I11	R6	C6	M7	A16	N6	T8	E10	H8
198	G19	P[31]	I11	R6	C6	M7	A16	N6	T8	E10	H8

FONTE: (BESERRA, 2017).

5.5 ANÁLISES DE RECOMBINAÇÃO

Foram encontrados eventos de recombinação, entre as amostras definidas no estudo, nos genes codificadores das proteínas NSP2, VP1, VP3 e VP7 em pelo menos três métodos implementados no RDP4 e no GARD, simultaneamente. Nos demais genes (NSP1, NSP3-5, VP2, VP4 e VP6) não foi observada ocorrência de recombinações.

No quadro 5 estão representados todos os eventos de recombinação detectados nas amostras do estudo, as possíveis sequências doadoras e a região do alinhamento onde estes eventos ocorreram.

Todas as amostras do estudo consideradas recombinantes apresentaram eventos de recombinação com outras amostras pertencentes ao mesmo genotipo, com exceção da amostra 42, pertencente ao genotipo G19, que apresentou como sequência doadora a sequência Tu-03V0001E10, originária de

peru e pertencente ao genótipo G22, e como relacionada a sequência 117, originária de frango de corte e genótipo G19.

Quadro 5 – Eventos de recombinação detectados nas amostras aviárias geradas no estudo, de acordo com métodos disponíveis no programa RDP4 – São Paulo – 2017

Gene	Amostra recombinante	Sequência doadora/relacionada	Fragmento recombinante/região do alinhamento	Métodos	Faixa de valor de p
NSP2	121	117/7	543-882	MaxChi 3Seq BootScan SiScan GeneCov Chimaera	$1,6 \times 10^{-6}$ $2,7 \times 10^{-9}$ $3,4 \times 10^{-5}$ $4,1 \times 10^{-7}$ $5,7 \times 10^{-3}$ $9,6 \times 10^{-7}$
VP1	65	1/28	689-1320	RDP 3Seq Chimaera SiScan MaxChi GeneCov	$1,2 \times 10^{-6}$ $1,2 \times 10^{-10}$ $1,5 \times 10^{-7}$ 3×10^{-12} $4,8 \times 10^{-10}$ $8,2 \times 10^{-6}$
VP3	28	103/65	674-1340	Chimaera SiScan MaxChi 3Seq GeneCov RDP	$1,6 \times 10^{-15}$ $1,7 \times 10^{-20}$ $2,1 \times 10^{-18}$ $2,1 \times 10^{-32}$ $4,5 \times 10^{-18}$ $7,3 \times 10^{-22}$
	65	121/22	867-1282	RDP GeneCov MaxChi	$1,1 \times 10^{-5}$ $2,9 \times 10^{-4}$ 7×10^{-3}
	121	117/7	670-1282	3Seq MaxChi Chimaera GeneCov	$1,7 \times 10^{-7}$ $3,4 \times 10^{-4}$ $6,8 \times 10^{-4}$ $7,7 \times 10^{-3}$
VP7	42	Tu-03V0001E10/117	74-208	3Seq MaxChi RDP Chimaera	$3,7 \times 10^{-10}$ $7,3 \times 10^{-3}$ $8,1 \times 10^{-8}$ $9,6 \times 10^{-4}$

FONTE: (BESERRA, 2017).

5.6 ANÁLISES DE PRESSÃO DE SELEÇÃO

Os códons dos alinhamentos das proteínas aqui estudadas, mesmo alinhamento utilizado nas análises dos itens 4.6, 4.7 e 4.8 dos materiais e métodos, foram analisados por métodos seis diferentes disponíveis no servidor Datamonkey. Aqueles que apresentaram pressão de seleção positiva por pelo menos três métodos, estão apresentados no quadro 6.

Quadro 6 – Análises de pressão de seleção e posições dos códons, de cada uma das proteínas estudadas, onde foi encontrada pressão positiva – São Paulo – 2017

Gene/Método	SLAC	FEL	IFEL	REL	MEME	FUBAR
NSP1	ND	187	187	ND	187	ND
VP2	198	198	198	ND	198	ND
VP3	ND	13	ND	13	13	13

FONTE: (BESERRA, 2016).

Legenda: Foram considerados significantes os resultados por SLAC, FEL, IFEL, MEME com valor $p < 0,1$, fator de Bayes 50 para REL e probabilidade *a posteriori* $> 0,9$ para FUBAR. ND= não detectado.

Foram analisados 36 sequências e 349 códons de um alinhamento do gene codificador da NSP1, dos quais 1 apresentou pressão positiva e 266 sítios apresentaram pressão negativa em pelo menos um dos métodos. Com relação à VP2, foram analisadas 30 sequências e 237 códons, com 1 sítio apresentando pressão positiva e 196 pressão negativa. Já em relação à VP3, foi analisado o alinhamento de 28 sequências e 446 códons, tendo 1 sítio apresentado pressão positiva e 415 pressão negativa.

6 DISCUSSÃO

O rotavírus é uma importante etiologia associada às enterites resultando em doença clínica principalmente em aves jovens (RIOS et al., 2012). Sua ocorrência é diversa, afetando galinhas, faisões, perus e avestruzes (MALIK et al., 2015). A análise de sequências de todos os 11 segmentos genômicos dos rotavírus aviários fornece um entendimento de sua diversidade e seus mecanismos de evolução viral, uma vez que todos estes segmentos são vulneráveis a eventos de recombinação e estudos de apenas alguns genes podem não ser suficientes na obtenção de dados acerca da diversidade genética do vírus (GOSH; KOBAYASHI, 2011). Até no momento, inexistiam estudos de todos os genes dos AvRV no Brasil.

Descrevemos aqui, diferentes frequências de ocorrência de RVA nas amostras deste estudo, tendo como alvos os genes codificadores das proteínas NSP5 e VP6. A frequência variou de 9,73% a 18,14% (VP6 e NSP5, respectivamente), com maior ocorrência em frango de corte e menor em avozeiros (item 3.3). Uma das hipóteses para se explicar a disparidade entre o número de amostras positivas triadas se deve ao fato da reação que tem como alvo a NSP5 ser do tipo *nested-PCR*, o que aumenta a sensibilidade diagnóstica, mas implica em eventuais resultados do tipo falso positivos.

As frequências de ocorrência deste estudo são semelhantes àquelas descritas anteriormente em nosso país (ALFIERI et al., 1989; TAMEHIRO et al., 2003; VILLARREAL et al., 2006; ASANO et al., 2011; SILVA et al., 2011; RIOS et al., 2012; BESERRA et al., 2014a; METTIFOGO et al., 2014). Estes dados permitem observar a presença disseminada dos rotavírus em aves no Brasil, visto que em 6 estados brasileiros foi detectada a circulação do agente, especialmente em criações localizadas nas regiões Sul e Sudeste, as quais são mais expressivas em termos de produção. Devido a limitações amostrais, não é possível extrapolar quanto a uma maior prevalência da infecção nestes plantéis, ou mesmo pela degradação do RNA viral devido ao transporte e conservação, mesmo tratando-se de um vírus relativamente resistente (ESTES; GREENBERG, 2013).

Se considerada a modalidade de criação, uma menor frequência de ocorrência em avozeiros pode estar associada a melhores condições de manejo,

sobretudo no que diz respeito aos aspectos de biossegurança. Por outro lado, uma maior ocorrência em frango de corte justifica-se pela idade das aves, já que o vírus é tipicamente encontrado em animais jovens (VILLARREAL et al., 2006; YAMAMOTO et al., 2011; METTIFOGO et al., 2014), além do tipo de criação em que há maior densidade populacional, favorecendo uma rápida disseminação do vírus (KOOPMANS; DUIZZER, 2004; ESTES; GREENBERG, 2013).

Apesar da importância dos AvRV, o número de sequências disponíveis no *Genbank* ainda é limitado. As amostras deste trabalho representam um dos poucos estudos de diversos genes de RVA em aves, em adição aos estudos das amostras PO-13, Ch-2G3, 03V0002E10, 10V0112H5, Ho374 e RK1, originárias de pombo, galinha, peru, faisão, gaivota e pato respectivamente (ITO et al., 2001; TROJNAR et al., 2009; TROJNAR et al., 2012).

Pela análise das árvores filogenéticas apresentadas neste estudo, todas as amostras aqui caracterizadas agruparam-se em clados tipicamente aviários e segregados das demais espécies, suportados por elevados valores de *bootstrap*, uma vez que por suas características epidemiológicas e evolutivas, apresentam baixa identidade com as amostras de mamíferos (TROJNAR et al., 2009).

Das 10 amostras que tiveram todos os seus genes sequenciados, pôde-se observar através da filogenia, matrizes de identidade e consulta a base de dados RotaC (MAES et al., 2009), duas diferentes constelações: G19-P[31]-I11-R6-C6-M7-A16-N6-T8-E10-H8, em 9 amostras e G19-P[31]-I4-R4-C4-M4-A16-N4-T4-E4-H4 em uma amostra. Esta última, originária de frango de corte, apresenta em geral, maior similaridade com as amostras PO-13 e 03V0002E10, originárias de pombo e peru, respectivamente, devido à uma série de inserções e deleções observadas nessas amostras (ITO et al., 2001). Estudos demonstraram que os AvRV se separaram dos RV de mamíferos durante os estágios iniciais do seu processo evolutivo (ITO et al., 2001), razão pela qual possuem baixa identidade de sequências e consequentemente não compartilham genótipos em comum (TROJNAR et al., 2009). No entanto, sabe-se também que a transmissão interespecie entre AvRV e RV de mamíferos ocorre naturalmente (BRUSSOW et al., 1992), já tendo sido descrita inclusive no Brasil (ASANO et al., 2011; SILVA et al., 2012; BESERRA et al., 2014a), onde genótipos tipicamente suínos e bovinos foram descritos em aves.

No que diz respeito aos genes codificadores da VP7 (Figura 13) e VP4 (Figura 14), todas as amostras apresentaram, a combinação G19P[31] tipicamente encontrada em aves, já descrita em amostras fecais de frango de corte sem sintomas na Alemanha (SCHUMANN et al., 2009) e no Brasil em aves de criação comercial (BESERRA et al., 2014a).

Os dados acerca da diversidade genética dos rotavírus aviários é limitado e no Brasil se restringe à caracterização dos genótipos P, G e E. Tendo sido descritos sete genótipos G (G1, G5, G6, G8, G10, G11 e G19) e três genótipos P (P[1], P[7] e P[31]), além de quatro combinações de G e P terem sido identificadas: G6P[1], G1P[7], G10P[1] e G19P[31] (ASANO et al., 2011; SILVA et al., 2012; BESERRA et al., 2014a). Algumas amostras caracterizadas nestes estudos, apresentam genótipos e combinações de genótipos tipicamente bovino (G8) e suíno (G5 e G11), o que, como dito anteriormente evidencia a ocorrência de transmissão interespecie (SILVA et al., 2012).

Com relação ao gene codificador da NSP4 (Figura 6), já foi descrito no país o genótipo E10 em amostras aviárias nos estados do Pará e de São Paulo (SILVA et al., 2013; METTIFOGO et al., 2014) e em nove amostras deste estudo. Como demonstrado na figura 6, as amostras aqui caracterizadas pertencentes ao genótipo E10, apresentam baixo nível de diversidade genética e estão mais relacionadas com as demais amostras brasileiras (SILVA et al., 2013). Além deste, foi detectado pela primeira vez no Brasil o genótipo E4 em uma amostra deste estudo, mesmo genótipo que as amostras de faisão, peru e pombo já descritas (ITO et al., 2001; TROJNAR et al., 2009; TROJNAR et al., 2013).

Análises filogenéticas da VP6 de amostras aviárias brasileiras demonstraram um baixo nível de diversidade genética dentro do genótipo I11 (Figura 12) uma vez que as 9 amostras pertencentes a este genótipo agruparam-se em um clado específico, o que sugere uma regionalização dos rotavírus circulantes no país. No entanto, uma amostra brasileira, está mais relacionada com amostra de peru, pombo e faisão em um clado a parte e separado das demais. Apesar da importância desta proteína na diferenciação de grupos e no desenvolvimento de testes diagnósticos dos RVs (ZHU et al., 2013), no Brasil se os estudos se limitam à caracterização de amostras suínas (SILVA et al., 2015).

Similarmente, as mesmas nove amostras agruparam-se nos genótipos R6 (Figura 8), C6 (Figura 9) e M7 (Figura 10), no que diz respeito aos genes

codificadores das proteínas VP1, VP2 e VP3, respectivamente. Enquanto que uma amostra se agrupou nos genótipos R4, C4 e M4, mesmo clado formado por amostras de pombo, faisão. Com relação a estes genes, os AvRV aqui caracterizados apresentaram baixo nível de diversidade dentro dos seus respectivos genótipos.

Os genes codificadores das proteínas NSP2 e NSP5 são considerados os mais conservados dos RVs (THEUNS et al., 2015). De fato, as amostras deste estudo demonstraram um baixo nível de diversidade genética dentro dos genótipos N6 e H8, respectivamente (Figuras 4 e 7). Resultados semelhantes foram descritos em análise de múltiplos segmentos de RV suíno no Brasil (SILVA et al., 2015). Além destes genes, observou-se ainda baixa diversidade entre as amostras pertencentes ao genótipo T8 (Figura 5) do gene codificador da NSP3 dos RVs aviários.

No que diz respeito à NSP1, apesar de todas as amostras do estudo agruparem-se no genótipo A16 (Figura 3), observou-se elevada variabilidade genética intra genotípica. Sabe-se que a NSP1 dos AvRV apresenta uma série de inserções e deleções em algumas regiões das sequências, com funções ainda não esclarecidas, que conferem essa elevada variabilidade à proteína (ITO et al., 2009; TROJNAR et al., 2009, 2013).

Sabe-se que a distribuição dos genótipos de RVA flutuam geográfica e temporalmente na ausência de vacinação, mas os mecanismos completos acerca desta flutuação ainda não estão totalmente esclarecidos (BANYAI et al., 2012), especialmente em amostras aviárias, uma vez que não existem vacinas disponíveis e conseqüentemente não ocorre a alteração de genótipos oriunda da pressão vacinal. Nestes casos, acredita-se que a variação de genótipos seja proveniente de fatores eventos de recombinação e de pressão de seleção (BANYAI et al., 2012).

Estudos acerca de eventos de recombinação nos RVs são raros (PHAN et al., 2007ab; DONKER et al., 2011), especialmente no rotavírus aviário, além disso, pouco se sabe sobre como ocorrem estas recombinações (WOODS, 2015). No entanto tais eventos foram detectados neste estudo nos genes codificadores das proteínas NSP2, VP1, VP3 e VP7, com uma frequência relativamente alta, uma vez que das 110 sequências aqui definidas, 6 (5,45%) apresentaram evidência de recombinação (Quadro 6).

Uma elevada frequência foi também detectada em estudos de recombinação da VP7, no qual, 2,3% das sequências foram consideradas recombinantes (PHAN et al., 2007). O contrário foi encontrado em trabalho anterior de recombinação na NSP2, nos quais foram descritas frequências de 0,68% respectivamente (DONKER et al., 2011).

As relativas baixas frequências de recombinação na NSP2 podem ser explicadas devido ao fato de possíveis rupturas por *breakpoints* em importantes regiões do gene serem responsáveis por não funcionamento correto das proteínas (DONKER et al., 2011). Dentre a sequência de NSP2 do estudo que apresentou recombinação, o fragmento recombinante está localizado dentro da região que compreende o domínio NTPase desta proteína (HU et al., 2012). Apesar disso, os *breakpoints* não poderiam influenciar no correto funcionamento da proteína, uma vez que eles não se localizam no resíduo de aminoácido 225 que funciona como resíduo catalítico para a função enzimática da NSP2 (KUMAR et al., 2007), não afetando nem a síntese de dsRNA e nem a formação dos viroplasmas. Interessantemente, a amostra recombinante de NSP2 (amostra 121), é originária de criação comercial de poedeiras e apresenta como sequências doadora e relacionada, as amostras 117 e 7 originárias de criação de frango de corte dos estados do Rio Grande do Sul e do Paraná, respectivamente (Quadro 6). Este mesmo evento de recombinação ocorreu com a mesma amostra, porém relacionado ao gene codificador da proteína VP3.

A amostra recombinante do gene codificador da VP7 (amostra 42, originária de frango de corte do estado de São Paulo), pertencente ao genótipo G19, apresenta como sequência doadora do fragmento recombinante a amostra Tu-03V0001E10, originária de peru e pertencente ao genótipo G22. Eventos de recombinação na VP7 são foram anteriormente estudados em humanos e suínos e como dito anteriormente, tais eventos aparecem com elevada frequência (PHAN et al., 2007ab; MARTINEZ et al., 2009).

Para o nosso conhecimento, esta é a primeira análise de pressão de seleção em códons realizada em amostras de rotavírus aviário. No entanto, a influência da pressão de seleção vem sendo estudada entre diferentes amostras de RVs em mamíferos, porém limitadas às proteínas VP7 e NSP4 (SONG; HAO, 2009; MALIK et al., 2014; CUNHA et al., 2015), no entanto pouco se sabe acerca das demais proteínas dos RVs (DONKER et al., 2011).

Na análise da NSP1, foi detectado 1 códon de sob pressão de seleção positiva, localizados no sítio 187 (Quadro 7). Porém o domínio *zinc finger* da proteína (aa 62 a 99), no qual estão presentes todos os resíduos funcionalmente importantes de cisteína (GRAFF et al., 2007), não apresentou seleção positiva. Como dito anteriormente, a função desta proteína na replicação viral ainda não está completamente esclarecida, no entanto, maior parte da proteína está sob pressão de seleção negativa.

De fato, espera-se que as proteínas estruturais e não estruturais, cuja função está relacionada à replicação viral e patogênese, mantenham-se conservadas para manter suas funções biológicas e dessa forma, espera-se que elas estejam sob seleção negativa. Por outro lado, as proteínas do capsídeo externo dos vírus são constantemente expostas ao sistema imune do hospedeiro e assim, estão sob pressão de seleção positiva a fim de evadir-se da resposta imune do hospedeiro (LOEWE et al., 2008; MALIK et al., 2014). Interessantemente as proteínas VP4 e VP7 dos AvRVs caracterizadas neste estudo, não apresentaram códons sob seleção positiva. Isso pode se dever ao fato de que os métodos utilizados para verificar evidência de seleção positiva baseados na proporção de mutações não sinônimas e sinônimas, ter se mostrado ineficaz, uma vez que a seleção natural atua somente em alguns sítios específicos e a maioria dos sítios em uma proteína estão sob seleção neutra ou negativa, desta forma ao se gerar a média dos sítios a razão será, na maioria das vezes menor ou igual a 1 (pressão negativa e neutra, respectivamente) (YANG, 2007).

Observou-se ainda que as proteínas estruturais de capsídeo interno VP2 e VP3 apresentaram 1 códon sob pressão positiva, cada uma, nos sítios 198 e 13, respectivamente (Quadro 7). Tais sítios não se encontram em regiões funcionalmente importantes destas proteínas (ITO e tal., 2001; TROJNAR et al., 2009).

Em resumo, os resultados deste estudo servem de base para o entendimento da diversidade genética dos rotavírus circulante nas aves de criações comerciais brasileiras, bem como evidencia a ocorrência de importantes eventos na evolução do vírus.

7 CONCLUSÕES

- a) Os rotavírus foram detectados em todos os tipos de criações comerciais estudados e em estados das regiões nordeste, centro-oeste, sudeste e sul do Brasil, com frequência de ocorrência variando de 9,73% a 18,14%.
- b) Duas constelações genotípicas tipicamente aviárias estão circulando entre as amostras brasileiras definidas neste estudo, sendo elas G19-P[31]-I11-R6-C6-M7-A16-N6-T8-E10-H8 (amostras 1, 7, 22, 28, 65, 103, 117, 121 e 198) e G19-P[31]-I4-R4-C4-M4-A16-N4-T4-E4-H4 (amostra 42).
- c) Observou-se ocorrência de recombinação com frequência de 5,45% em 4 (NSP1, VP1, VP3 e VP7) dos 11 genes de RVA estudados.
- d) Grande parte dos rotavírus aviários está sob pressão de seleção negativa e/ou neutra, uma vez que houve pressão de seleção positiva em apenas um códon dos genes codificadores das proteínas NSP1, VP2 e VP3.

REFERÊNCIAS

- ALFIERI, A. F.; ALFIEIRI, A. A.; RESENDE, J. S.; RESENDE, M. Atypical rotavirus infections among broiler chickens in Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 41, p. 81-82, 1989.
- ARIAS, C. F.; DECTOR, M. A.; SEGOVIA, L.; LOPEZ, T.; CAMACHO, M.; ISA, P.; ESPINOSA, R.; LOPEZ, S. RNA silencing of rotavirus gene expression. **Virus Research**, v. 102, p. 43-51, 2004.
- ASANO, K. M.; GREGORI, F.; SOUZA, S. P.; ROTAVA, D.; OLIVEIRA, R. N.; VILLARREAL, L. Y.; RICHTZENHAIN, L. J.; BRANDÃO, P. E. Bovine rotavirus in turkeys with enteritis. **Avian Diseases**, v. 55, p. 697-700. 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.
- ATTOUI, H.; MERTENS, P. P. C.; BECNEL, J.; BELAGANAHALLI, S.; ERGOIN, M.; BRUSSAARD, C. P.; CHAPPELL, J. D.; CIARLET, M.; DEL VAS, M.; DERMODY, T. S.; Reoviridae. IN: KING A, ADAMS M, CARSTENS E, LEFKWITZ E, editors. Virus taxonomy, ninth report of the international committee on taxonomy of viruses. Waltham (MA): Elsevier Academic Press, 2012; p. 497-650.
- AU, K. S.; MATTION, N. M.; ESTES, M. K. A subviral particle binding domain on the rotavirus nonstructural glycoprotein NS28. **Virology**, v. 194, p. 665-673, 1993.
- BALL, J. M.; TIAN, P.; ZENG, C. Q.; MORRIS, A. P.; ESTES, M. K. Age-dependent diarrhea induced by a rotaviral nonstructural rotavirus receptor glycoprotein. **Science**, v. 272, p. 101-104, 1996.
- BERGELAND, M. E.; MCADARAGH, J. P.; STOTZ, J. Rotaviral enteritis in turkey poults. In Proceedings of the 26th Western Poultry Disease Conference. University of California, Davis, CA, p. 129-130, 1977.
- BESERRA, L. A. R.; BARBOSA, B. R.; BERNARDES, N. T.; BRANDÃO, P. E.; GREGORI, F. Occurrence and characterization of rotavirus A in broilers, layers, and broiler breeders from Brazilian poultry farms. **Avian Diseases**, v. 58, n. 1, p. 153-157, 2014a.
- BESERRA, L. A. R.; GREGORI, F. Description of rotavirus F in broilers from Brazilian poultry farms. **Avian Diseases**, v. 58, p. 458-461, 2014b.
- BESERRA, L. A. R.; BERNARDES, N. T. C. G.; BRANDÃO, P. E.; GREGORI, F. Monitoring and molecular characterization of group D rotavirus in Brazilian poultry farms. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, n. 6, p. 536-540, 2015.

BEZERRA, D. A.; SILVA, R. R.; KAIANO, J. H.; SILVESTRE, R. V.; OLIVEIRA, D. S.; LINHARES, A. C.; GABBAY, Y. B.; MASCARENHAS, J. D. Detection of avian group D rotavirus using the polymerase chain reaction for the VP6 gene. **Journal of Virological Methods**, v. 185, p. 189-192, 2012.

BEZERRA, D. A.; SILVA, R. R.; KAIANO, J. H.; OLIVEIRA, D. S.; GABBAY, Y. B.; LINHARES, A. C.; MASCARENHAS, J. D. Detection, epidemiology and characterization of VP6 and VP7 genes of group D rotavirus in broiler chickens. **Avian Pathology**, v. 43, p. 238-243, 2014.

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

BONI, M. F.; POSADA, D.; FELDMAN, M. W. An exact nonparametric method for inferring mosaic structure in sequence triplets. **Genetics**, v. 176, p. 1035-1047, 2007.

BRUSSOW, H.; NAKAGOMI, O.; GERNA G.; EICHHORN, W. Isolation of anavianlike group A rotavirus from a calf with diarrhea. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, p. 67-73, 1992.

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

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

CHARPILLENNE, A.; LEPAULT, J.; REY, F.; COHEN, J. Identification of rotavirus VP6 residues located at the interface with VP2 that are essential for capsid assembly and transcriptase activity. **Journal of Virology**, v. 76, p. 7822-7831, 2002.

CUNHA, M. S.; BRANDÃO, P. E.; NISHIDA, M. K.; RUIZ, V. L. A.; GREGORI. Molecular analysis of nsp4 coding gene of porcine rotavirus in brazil. **Ars veterinaria**, Jaboticabal, SP, v.31, n.1, 42-49, 2015.

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.

DARREN, P. M.; MURRELL, B. M.; GOLDEN, A.; KHOOSAL, B. M. RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. **Virus Evolution**, 2015. doi: 10.1093/ve/vev003.

DAY, J. M.; SPACKMAN, E.; PANTIN-JACKWOOD, M. A multiplex RT-PCR test for the differential identification of turkey astrovirus type 1, turkey astrovirus type 2, chicken astrovirus, avian nephritis virus, and avian rotavirus. **Avian Diseases**, v. 51, p. 681-684, 2007.

DAY, M.; ZSAK, L. Recent progress in the characterization of avian enteric viruses. **Avian Diseases**, v. 57, n. 3, p. 573-580, 2013.

DEDEPSIDIS, E. et al. Correlation Between Recombination Junctions and RNA Secondary Structure Elements in Poliovirus Sabin Strains. **Virus Genes**, v. 41, p. 181-91, 2010.

DHAMA, K.; CHAUHAN, R. S.; MAHENDRAN, M.; MALIK, S. V. S. Rotavirus diarrhea in bovines and other domestic animals. **Veterinary Research Communications**, v. 33, p. 1-23, 2009.

DHAMA, K.; SAMINATHAN, M.; KARTHIK, K.; TIWARI, R.; SHABBIR, M. Z.; KUMAR, N.; MALIK, S.Y.; SINGH, K. R. 2015. Avian Rotavirus Enteritis - An Updated Review. **Veterinary Quarterly**, v. 8, p. 39-84, 2015.

DONKER, N. C.; BONIFACE, K.; KIRKWOOD, C. D. Phylogenetic analysis of rotavirus A NSP2 gene sequences and evidence of intragenic recombination. **Infects, Genetic and Evolution**, v. 11, p. 1602-1607, 2011.

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

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

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

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

ESTES, M. K.; GREENBERG, H. D. Rotaviruses. In: D.M. Knipe, P.M. Howley (Eds.), et al., Fields Virology (6th ed.), Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA (2013), pp. 1347-1401.

FLEWETT, T. H.; BRYDEIV, A. S.; DAVIES, H. A.; WOODE, O. N.; BRINGER, J. C.; DEMCK, J. M. Relation between viruses from acute gastroenteritis of children and new born calves. **Lancet**, p. 61-63, 1974.

FLORES, J.; SEARS, J.; GREEN, K. Y.; PEREZ-SCHAEEL, I.; MORANTES, A.; DAOUD, G. Genetic stability of rotaviruses recovered from asymptomatic neonatal infections. **Journal of Virology**, v. 62, p. 2778-4781, 1988.

GIBBS, M.J.; ARMSTRONG, J. S.; GIBBS, A. J. Sister-scanning: a Monte Carlo procedure for assessing signals in recombinant sequences. **Bioinformatics**, v. 16, p. 573-582, 2000.

- GHOSH, S.; KOBAYASHI, N. Whole-genomic analysis of rotavirus strains: current status and future prospects. **Future Microbiology**, v. 6, p. 1049-1065, 2011.
- GOUGH, R. E.; WOOD, G. W.; COLLINS, M. S.; SPACKMAN, D.; KEMP, J.; GIBSON, L. A. C. Rotavirus infection in pheasant poults. **Veterinary Record**, v. 116, p. 295, 1985.
- GOUGH, R. E.; WOOD, G. W.; SPACKMAN, D. Studies with an atypical avian rotavirus from pheasants. **Veterinary Record**, v. 118, p. 611-612, 1986.
- 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, 1994
- GRAFF, J. W.; EWEN, J.; ETTAYEBI, K.; HARDY, M. E. Zinc-binding domain of rotavirus NSP1 is required for proteasome-dependent degradation of IRF3 and autoregulatory NSP1 stability. **Journal of General Virology**, v. 88, p. 613-620, 2007.
- GREEN, K. Y.; SEARS, J. F.; TANIGUCHI, K.; MIDTHUN, K.; HOSHINO, Y.; GORZIGLIA, M. Prediction of human rotavirus serotype by nucleotide sequence analysis of the VP7 protein gene. **Journal of Virology**, v. 62, p. 1819-1823, 1988.
- GREENBERG, H.; MCAULIFFE, V.; VALDESUSO, J.; WYATT, R.; FLORES, J.; KALICA, A. Serological analysis of the subgroup protein of rotavirus, using monoclonal antibodies. **Infect and Immunity**, v. 39, p. 91-99, 1983.
- GUY, J. S. Virus infections of the gastrointestinal tract of poultry. **Poultry Science**, v. 77, p. 1166-1175, 1998.
- 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.
- HASEGAWA, M.; KISHINO, H.; YANO, T. Dating of human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. **Journal of Molecular Evolution**, v. 22, n. 2, p. 160-174, 1985.
- HEIMAN, E. M.; MACDONALD, S. M.; BARRO, M.; TARAPOREWALA, Z. F.; BARMAGEN, T.; PATTON, J.T. Group a human rotavirus genomics: evidence that gene constellations are influenced by viral protein interactions. **Journal of Virology**, v.82, n. 22, p. 11106-11116, 2008.
- 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, 1982.

HOLMES, E. C.; WOROBEY, M.; RAMBAUT, A. Phylogenetic evidence for recombination in dengue virus. **Molecular Biology Evolution**, v. 16, p. 405-409, 1999.

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.

ITO, H.; SUGIYAMA, M.; MASUBUCHI, K.; MORI, Y.; MINAMOTO, N. Complete nucleotide sequence of a group A avian rotavirus genome and a comparison with its counterparts of mammalian rotaviruses. **Virus Research**, v. 75, n. 2, p. 123-138, 2001.

JIANG, X.; JAYARAM, H.; KUMAR, M.; LUDTKE, S. J.; ESTES, M. K.; PRASAD, B. V. Cryoelectron microscopy structures of rotavirus NSP2-NSP5 and NSP2-RNA complexes: implications for genome replication. **Journal of Virology**, v. 80, p. 829-835, 2006.

JIANG, S.; JI, S.; TANG, Q.; CUI, X et al. Molecular characterization of a novel adult diarrhoea rotavirus strain J19 isolated in China and its significance for the evolution and origin of group B rotaviruses. **Journal of General Virology**, v. 89, p. 2622-2629, 2008.

JINDAL, N.; CHANDER, Y.; PATNAYAK, D. P.; MOR, S. K.; ZIEGLER, A. F.; GOYAL, S. M. A multiplex RT-PCR for the detection of astrovirus, rotavirus, and reovirus in turkeys. **Avian Diseases**, v. 56, p. 592-596, 2012.

JOHNE, R.; OTTO, P.; ROTH, B.; LÖHREN, U.; BELNAP, D.; REETZ, J.; TROJNAR, E. Sequence analysis of the VP6-encoding genome segment of avian group F and G rotaviruses. **Virology**, v. 442, p. 384-439, 2011.

JONES, R. C.; HUGHES, C. S.; HENRY, R. R. Rotavirus infection in commercial laying hens. **Veterinary Record**, v. 104, p. 22, 1979.

KANG, S. Y.; NAGARAJA, K. V.; NEWMAN, J. A. Rapid coagglutination test for detection of rotaviruses in turkeys. **Avian Diseases**, v. 29, p. 640-648, 1985.

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

KATTOOR, J. J.; MALIK, Y. S.; SHARMA, K.; KUMAR, N.; BATRA, M.; JINDAL, N.; SINGH, A. Molecular evidence of group D rotavirus in commercial broiler chicks in India. **Avian Biology Research**, v. 6, p. 313-316, 2013.

KAVANAGH, O. V.; AJAMIA, N. J.; CHENGA, E.; CIARLET, M.; ROBERTO, A.; GUERRERO, R. A.; ZENGA, C. Q. Y.; CRAWFORD, S. E.; ESTES, M. Rotavirus enterotoxin NSP4 has mucosal adjuvant properties. **Vaccine**, v. 28, p. 3106-3111, 2010.

KOO, B. S.; LEE, H. R.; JEON, E. O.; JANG, H. S.; HAN, M. S.; MO, I. P. An unusual case of concomitant infection with chicken astrovirus and group A avian rotavirus in broilers with a history of severe clinical signs. **Journal of Veterinary Science**, v. 14, p. 231-233, 2013.

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

KOSAKOVSKY POND S. L.; POSADA, D.; GRAVENOR, M. B.; WOELCK, C. H.; FROST, S. D. Automated phylogenetic detection of recombination using a genetic algorithm. **Molecular Biology Evolution**, v. 23, p. 1891-1901, 2006.

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

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0. **Molecular Biology and Evolution**, 2015, doi: 10.1093/molbev/msw054.

LARKIN, M.A. et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, v. 23, p. 2947-48, 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. 3213-3228, 1991.

LEFEUVRE, P. Widely Conserved Recombination Patterns Among Single-Stranded DNA Viruses. **Journal of Virology**, v. 83, p. 2697-707, 2009.

LEGROTTAGLIE, R.; RIZZI, V.; AGRIMI, P. Isolation and identification of avian rotavirus from pheasant chicks with signs of clinical enteritis. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 20, p. 205-210, 1997.

LOEWE, L. Negative selection. **Nature**, v. 1, n. 1, p. 59, 2008.

LU, X.; MCDONALD, S. M.; TORTORICI, M. A.; TAO, Y. J.; VASQUEZ DEL CARPIO, R.; NIBERT, M. L.; PATTON, J. T.; HARRISON, S. C. Mechanism for coordinated RNA packaging and genome replication by rotavirus polymerase VP1. **Structure**, v. 6, p. 1678-1688, 2008.

LUBLIN, A.; MECHANI, S.; BUMBAROV, V. Involvement of rotavirus in intestinal infections of poultry and pet birds. Abstract presented at the 28th annual Israel veterinary symposium in memory of Dr. Ora Egozi, 2004. **Israel Journal of Veterinary Medicine**, v. 59, p. 3, 2004.

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.

MAES, P.; MATTHIJNSSENS, J.; RAHMAN, M.; VAN RANST, M. RotaC: a web-based tool for the complete genome classification of group A rotaviruses. **BMC Microbiology**, v. 9, p. 238, 2009.

MALIK, Y. P. S.; SHARMA, K.; VAID, N.; CHAKRAVARTI, S.; CHANDRASHEKAR, K. M.; BASERA, S. S.; SINGH, R.; MINAKSHI.; PRASAD, S.; GULATI, B. R. Frequency of group A rotavirus with mixed G and P genotypes in bovines: predominance of G3 genotype and its emergence in combination with G8/G10 types. **Journal Veterinary Science**, v.13, p. 271-278, 2012.

MALIK, Y. P. S.; KUMAR, N.; SHARMA, K.; SHARMA, R.; KUMAR, H. B.; KUSUMAKAR, A.; KUMARI, S.; SHUKLA, S.; CHANDRASHEKAR, K. M. Epidemiology and genetic diversity of rotavirus strains associated with acute gastroenteritis in bovine, porcine, poultry and human population of Madhya Pradesh, Central India 2004-2008. **Advances in Animal Veterinary Science**, v. 1, p. 111-115, 2013.

MALIK, Y.S.; KUMAR, N.; SHARMA, K.; GHOSH, S.; BÁNYAI, K.; BALASUBRAMANIAN, G.; KOBAYASHI, N.; MATTHIJNSSENS, J. Molecular analysis of non-structural rotavirus group A enterotoxin gene of bovine origin from India. **Infection, Genetics and Evolution**, v.25, p.20-27, 2014.

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

MARTHALER, D.; ROSSOW, K.; CULHANE, M.; GOYAL, S.; COLLINS, J.; MATTHIJNSSENS, J.; NELSON, M.; CIARLET, M. Widespread rotavirus H in commercially raised pigs, United States. **Emerging Infectious Diseases**, v. 20, p.1195-1198, 2014.

MARTIN, D.; RYBICKI, E. RDP: Detection of recombination amongst aligned sequences. **Bioinformatics**, v. 16, p. 562-563, 2000.

MARTIN, D. P.; POSADA, D.; CRANDALL, K. A.; WILLIAMSON, C. A modified bootscan algorithm for automated identification of recombinant sequences and recombination breakpoints. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 21, p. 98-102, 2005.

MARTIN, D.; OULDALI, M.; MENETREY, J.; PONCET, D. Structural of the rotavirus nonstructural protein NSP5. **Journal of Molecular Biology**, v. 413, n. 1, p.209-221, 2011.

MARTIN, D. M. B.; GOLDEN, M.; KHOOSAL, A.; MUHIRE, B. RDP4: detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. **Virus Evolution**, v. 1, 2015.

MARTÍNEZ-LASO, J.; ROMÁN, A.; RODRIGUEZ, M.; CERVERA, I.; HEAD, J.; RODRÍGUEZ-AVIAL, I.; PICAZO, J.J.; 2009. Diversity of the G3 genes of human rotaviruses in isolates from Spain from 2004 to 2006: cross-species

transmission and inter-genotype recombination generates alleles. **Journal of General Virology**, v. 90, p. 935-943, 2009.

MASCARENHAS, J. D. P. Caracterização molecular de genótipos de rotavírus do grupo A em Belém, Pará, no período de 1990 a 2003: estudo em neonatos, crianças diarreicas de 0-3 anos e ensaio clínico com vacinas. 2006. Tese (Doutorado em Biologia Parasitária) – Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, São Paulo, 2006.

MASCARENHAS, J. D.; BEZERRA, D. A.; SILVA, R. R.; SILVA, M. J.; JÚNIOR, E. C.; SOARES, L. S. Detection of the VP6 gene of group F and G rotaviruses in broiler chicken fecal samples from the Amazon region of Brazil. **Archives of Virology**, v. 161, n. 8, p. 2263-2268, 2015.

MATHIEU, M.; PETITPAS, I.; NAVAZA, J.; LEPAULT, J.; KOHLI, E.; POTHIER, P.; PRASAD, B. V. V.; COHEN, J.; REY, F. A. Atomic structure of the major capsid protein of rotavirus: implications for the architecture of the virion. **The EMBO Journal**, v. 20, p. 1485-1497, 2001.

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.

MATTHEWS, R. E. Third report of the international committee on taxonomy of viruses. classification and nomenclature of viruses. **Intervirology**, v. 12, p. 129-296, 1979.

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

MATTHIJNSSENS, J.; 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.; VAN RANST, M. Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. **Archives of Virology**, v. 153, p. 1621-1629, 2006.

MATTHIJNSSENS, J.; RAHMAN, M.; CIARLET, M.; ZELLER, M.; HEYLEN, E.; NAKAGOMI, T.; UCHIDA, R.; HASSAN, Z.; AZIM, T.; NAKAGOMI, O.; VAN RANST, M. Reassortment of human rotavirus gene segments into G11 rotavirus strains. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, p. 625-630, 2010.

MATTHIJNSSENS, J.; OTTO, P.; CIARLET, M.; DESSELBERGER, U.; VAN RANST, M.; JOHNE, R. VP6 sequence-based cut-off values as a criterion for rotavirus species demarcation. **Archives of Virology**, v. 157, p. 1177-1182, 2011.

MATTHIJNSSENS, J.; VAN RANST, M. Genotype constellation and evolution of group A rotaviruses infecting humans. **Current Opinion in Virology**, v. 2, n. 4, p. 426-433, 2012.

MATTION, N. M.; COHEN, J.; APONTE, C.; ESTES, M. K. Characterization of an oligomerization domain and RNA-binding properties on rotavirus nonstructural protein NS34. **Virology**, v. 190, p. 68-83, 1992.

MAYNARD SMITH, J. Analyzing the Mosaic Structure of Genes. **Journal of Molecular Evolution**, v. 34, p. 126-129, 1992.

MEBUS, C. A.; UNDERDAHL, N. R.; RHODES, M. B.; TWIEHAUS, M. J. Calf diarrhea (Scours): reproduced with a virus from a field outbreak Nebraska. **Research Bulletin**, v. 233, 1969.

METTIFOGO, E.; NUÑEZ, L.F. N.; CHACON, J. L.; SANTANDER, S. L. H.; ASTOLFI-FERREIRA, C. S.; JEREZ, J.A.; JONES, R. C.; PIANTINO-FERREIRA, A. J. 2014. Emergence of Enteric Viruses in Production Chickens is a Concern for Avian Health. **Scientific World Journal**. ID450423. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/450423>.

MCDONALD, S. M.; PATTON, J. T. Rotavirus VP2 core shell regions critical for viral polymerase activation. **Journal of Virology**, v.85, n.7, p. 3095-3105, 2011.

MCNULTY, M. S. Rotaviruses. **Journal of General Virology**, v. 40, p. 1-18, 1978.

MCNULTY, M. S. Rotavirus infections. In: Saif YM, Barnes HJ, Glisson JR, Fadly AM, McDougald LR, Swayne DE, editors. Diseases of poultry. Ames (IA): Iowa state press. p. 308-317, 2003.

MCNULTY, M. S.; REYNOLDS, D. L. 2008. Rotavirus infections. In: SaifYM, Fadley AM, Glission JR, Mc Dougald LR, Nolan LK, Swayne DE, editors. Diseases of poultry. 12th ed. Ames(IA): Blackwell Publishing Professional; p. 338-350.

MIHALOV-KOVÁCS, E.; GELLÉRT, A.; MARTON, S.; FARKAS, S. L.; FEHÉR, E.; OLDAL, M.; JAKAB, F.; MARTELLA, V.; BÁNYAI, K. Candidate new rotavirus species in sheltered dogs, Hungary. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 4, p. 660-663, 2015.

MINAMOTO, N.; YUKI, M. Inactivation of several animal viruses by glutaraldehyde. **Journal of the Japanese Veterinary Medical Association**, v. 41, p. 497-501, 1988.

MONINI, M.; ZACCARIA, G.; IANIRO, G.; LAVAZZA, A.; VACCARI, G.; RUGGERI, F.M. Full-length genomic analysis of porcine rotavirus strains isolated from pigs with diarrhea in Northern Italy. **Infection Genetics and Evolution**, v. 25, p. 4-13, 2014.

MOURA-ALVAREZ, J.; NUNEZ, L. F.; ASTOLFI-FERREIRA, C. S.; KNOBL, T.; CHACÓN, J. L.; MORENO, A. M.; JONES, R. C.; FERREIRA, A. J. Detection of

enteric pathogens in Turkey flocks affected with severe enteritis in Brazil.

Tropical Animal Health Production, v. 46, n. 6, p. 1051-1058, 2014.

NAGASHIMA, S.; KOBAYASHI, N.; ISHINO, M et al. Whole genomic characterization of a human rotavirus strain B219 belonging to a novel group of the genus Rotavirus. **Journal of Medical Virology**, v. 80, p. 2023-2033, 2008.

NAKAGOMI, O.; NAKAGOMI, T.; AKATAN, K.; IKEGAMI, N. Identification of rotavirus genogroups by RNA–RNA hybridization. **Molecular and Cellular Probes**, v. 3, p. 251-261, 1989.

OGDEN, K. M.; SNYDER, M. J.; DENNIS, A. F.; PATTON, J. T. Predicted structure and domain organization of rotavirus capping enzyme and innate immune antagonist VP3. **Journal of Virology**, v. 88, p. 9072-9085, 2014.

ORR, H. A. fitness and its role in evolutionary genetics. **Nature Reviews Genetics**, v. 10, n. 8, p. 531-539, 2009.

OTTO, P. H.; AHMED, M. U.; MACHNOWSKA, P.; REETZ, J.; ROTH, B.; TROJNAR, E.; JOHNE, R. Detection of avian rotaviruses of groups A, D, F and G in diseased chickens and turkeys from Europe and Bangladesh. **Veterinary Microbiology**, v. 156, p. 8-15, 2012.

PADIDAM, M.; SAWYER, S.; FAUQUET, C. M. Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination. **Virology**, p. 265, v. 218-225, 1999.

PANTIN-JACKWOOD, M. J.; SPACKMAN, E.; DAY, J. M.; RIVES, D. Periodic monitoring of commercial turkeys for enteric viruses indicates continuous presence of astrovirus and rotavirus on the farms. *Avian Diseases*, v. 51, p. 674, 2007

PANTIN-JACKWOOD, M. J.; MICHAEL-DAY, J.; JACKWOOD, M. W.; SPACKMAN, E. Enteric viruses detected by molecular methods in commercial chicken and turkey flocks in the United States between 2005 and 2006. **Avian Diseases**, v. 52 p. 235-244, 2008.

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. 1713-16, 2004.

PATTON, J. T.; SPENCER E. Genome replications and packaging of segmented double-strand RNA viruses. **Virology**, v. 277, p. 217-225, 2000.

PATTON, J. T.; VASQUEZ-DEL CARPIO, R.; TORTORICI, M. A.; TARAPOREWALA, Z. F. Coupling of rotavirus genome replication and capsid assembly. **Advances in Virus Research**, v. 69, p. 167-201, 2007.

PHAN, T.G.; OKITSU, S.; MANEEKARN, N.; USHIJIMA, H. Genetic heterogeneity, evolution and recombination in emerging G9 rotaviruses. **Infection Genetics and Evolution**, v. 7, p. 656-663, 2007a.

PHAN, T.G.; OKITSU, S.; MANEEKARN, N.; USHIJIMA, H. Evidence of intragenic recombination in G1 rotavirus VP7 genes. **Journal of Virology**, v. 81, p. 10188-10194, 2007b.

POSADA, D.; CRANDALL, K. A. Evaluation of methods for detecting recombination from DNA sequences: computer simulations. **Proceedings of National Academy of Sciences**, v. 98, p. 13757-13762, 2001.

RIOS, R. L.; MARIN, S. Y.; GOMES, A. M.; RESENDE, J. S.; BONFIM, M. R. Q.; GOMES, A. D.; RESENDE, F. M. S.; HORTA, R. S.; RESENDE, M.; MARTINS, N. R. S. The occurrence of Orthoreovirus, Rotavirus and chicken anemia virus in chickens of the poultry industry in Minas Gerais, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, n. 6, p. 1613-1620, 2012.

SAIF, L. J.; SAIF, Y. M.; THEIL, K. W. Enteric viruses in diarrheic turkey poult. **Avian Diseases**, v. 29, p. 798-811, 1985.

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

SALMINEN, M. O. et al. Identification of Breakpoints in Intergenotypic Recombinants of HIV Type 1 by BOOTSCANing, **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 11, p. 1423-1425, 1985.

SAVITA, K. A. L.; MALIK, Y. P. S.; PRASAD, M. Detection and characterization of group A and D avian rotaviruses in India. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 7, p. 554-556, 2008.

SCHUMANN, T.; HOTZEL, H.; OTTO, P.; JOHNE, R. Evidence of interspecies transmission and reassortment among avian group A rotaviruses. **Virology**, v. 386, p. 334-343, 2009.

SILVA, L. C.; SANCHE, A. A.; GREGORI, F.; BRANDÃO, P. E.; ALFIERI, A. A.; HEADLEY, S. A.; JEREZ, J. A. First description of group A rotavirus from fecal samples of ostriches (*Struthio camelus*). **Research Veterinary Science**, v. 93, p. 1066-1069, 2012.

SILVA, R. R., et al. Molecular epidemiology of avian rotavirus in fecal samples of broiler chickens in Amazon Region, Brazil, from August 2008 to May 2011. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 4, n. 2, p. 55-62, 2013.

SILVA, F. D.; ESPINOZA, L. R.; TONIETTI, P. O.; BARBOSA, B. R.; GREGORI, F. Whole-genomic analysis of 12 porcine group A rotaviruses isolated from symptomatic piglets in Brazil during the years of 2012–2013. **Infection Genetics and Evolution**, v. 32, p.239-254, 2015.

SMITH, J.M. Analyzing the mosaic structure of genes. **Journal of Molecular Evolution**, v. 34, p. 126-129, 1992.

SIMON-LORIERE, E. et al. RNA Structures Facilitate Recombination-Mediated Gene Swapping in HIV-1. **Journal of Virology**, v. 84, p. 12675-12682, 2010.

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

STUCKER, K. M.; STOCKWELL, T. B.; NYAGA, M. M.; HALPIN, R. A.; FEDOROVAN, A. A.; NGOVENI, H.; PEENZE, I.; SEHERI, M. L.; MPHAAHLELEMJ, W.D. E. Complete genomic sequence for an avian group g rotavirus from South Africa. **Genome Announcements**, p. 107-115, 2015.

TAKEHARA, K.; KIUCHI, H.; KUWAHARA, M.; YANAGISAWA, F.; MIZUKAMI, M.; MATSUDA, H.; YOSHIMURA, M. Identification and characterization of a plaque forming avian rotavirus isolated from a wild bird in Japan. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 53, p. 479-486, 1991.

TAMEHIRO, C. Y.; ALFIERI, A. F.; MEDICI, K. C.; ALFIERI, A. A. Segmented double-stranded genomic RNA viruses in fecal samples from broiler chicken. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, n. 4, 2003.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEU, M.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, p. 2725-2729, 2013.

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

TAYLOR, J. A.; OBREIN, J. A.; YEAGER, M. The cytoplasmic tail of nsp4, the endoplasmic reticulum-localized non-structural glycoprotein of rotavirus, contains distinct virus binding and coiled coil domains. **The EMBO Journal**, v. 15, p. 4469-4476, 1996.

THEIL, K. W.; SAIF, L. J. Age-related infections with rotavirus, rotavirus-like virus, and atypical rotavirus in turkey flocks. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 25, p. 333-337, 1987.

THEUNS, S.; HEYLEN, E.; ZELLER, M.; ROUKAERTS, I. D.; DESMARETS, L. M.; VAN RANST, M.; NAUWYNCK, H. J.; MATTHIJNSSENS, J. Complete genome characterization of recent and ancient Belgian pig group A rotaviruses and assessment of their evolutionary relationship with human rotaviruses. **Journal of Virology**, v. 89, p. 1043-1057, 2015.

TONIETTI, P. O.; DA HORA, A. S.; SILVA, F. D.; FERRARI, K. L.; BRANDÃO, P. E.; RICHTZENHAIN, L. J.; GREGORI, F. Simultaneous detection of group A rotavirus in Swine and rat on a pig farm in Brazil. **Scientific World Journal**, 2013, doi: 10.1155/2013/648406.

TROJNAR, E.; OTTO, P.; JOHNE, R. The first complete genome sequence of a chicken group A rotavirus indicates independent evolution of mammalian and avian strains. **Virology**, v. 386, n. 2, p. 325-333, 2009.

TROJNAR, E.; SACHSENRODER, J.; TWARDZIOK, SVEN.; JOCHEN, R.; OTTO, P. H.; JOHNE, R. Identification of an avian group A rotavirus containing a novel VP4 gene with a close relationship to those of mammalian rotaviruses. **Journal of General Virology**, v. 94, p. 136-142, 2013.

WOODS, R. J. Intrasegmental recombination does not contribute to the long-term evolution of group A rotavirus. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 32, p. 354-360, 2015.

UBABEF - Associação Brasileira dos Exportadores de Frango. Relatórios. Disponível em: <<http://www.ubabef.com.br/files/publicacoes/732e67e684103de4a2117dda9ddd280a.pdf>>. Acesso em: 10 de março de 2017

VARGHESE, V.; DAS, S.; SINGH, N.B.; KOJIMA, K.; BHATTACHARYA, S.K.; KRISHNAN, T.; KOBAYASHI, N.; NAIK, T.N. Molecular characterization of a human rotavirus reveals porcine characteristics in most of the genes including VP6 and NSP4. **Archives of Virology**, v. 149, n. 1, p. 155-172, 2004.

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

VILLARREAL, L. Y. B.; ULIANA, G.; VALENZUELA, C.; CHACÓN, J. L. V.; SAIDENBERG, A. B. S.; SANCHES, A. A.; BRANDÃO, P. E.; JEREZ, J. A.; FERREIRA, A. J. P. Rotavirus detection and isolation from chickens with or without symptoms. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 8, n. 3, 2006.

YAMAMOTO, D.; GHOSH, S.; KUZUYA, M.; WANG, Y. H.; ZHOU, X.; CHAWLASARKAR, M.; PAUL, S. K.; ISHINO, M.; KOBAYASHI, N. Whole-genome characterization of human group C rotaviruses: identification of two lineages in the VP3 gene. **Journal of General Virology**, v. 92, p. 361-369, 2011.

YANG, Z.; NIELSEN, R. Estimating synonymous and nonsynonymous substitution rates under realistic evolutionary models. **Molecular Biology and Evolution**, v. 17, p. 32-43, 2000.

YASON, C. V.; SCHAT, K. A. Isolation and characterization of avian rotaviruses. **Avian Diseases**, v. 29, p. 499-508, 1985.

ZHANG, M.; ZENG, C.Q.; DONG, Y. Mutations in rotavirus nonstructural glycoprotein NSP4 are associated with altered virus virulence. **Journal of Virology**, v. 72, p. 3666-3672, 1998.

ZHANG, M.; ZENG, C. Q.; MORRIS, A. P.; ESTES, M. K. A functional NSP4 enterotoxin peptide secreted from rotavirus-infected cells. **Journal of virology**, v. 74, n. 24, p. 11663-11670, 2000.

ZHU, J.; YANG, Q.; CAO, L.; DOU, X.; ZHAO, J.; ZHU, W.; DING, F.; BU, R. E.; SUO, S.; REN, Y.; LI, G.; REN, X. Development of porcine rotavirus VP6 protein

based ELISA for differentiation of this virus and other viruses. **Virology Journal**, v. 10, n.1, p. 91, 2013

Anexo A – Identificação, estado de origem, tipo de criação e resultados das reações de PCR visando amplificação dos genes codificadores das proteínas NSP5 e VP6, das amostras utilizadas no estudo (continua) – São Paulo – 2017

(continua)

ID	Estado de Origem	Tipo de Criação	PCR NSP5 (Salem et al., 2010)	PCR VP6 (Desenhado no estudo)
1*	NI	NI	Positivo	Positivo
2	ES	Postura	Negativo	Negativo
3	PR	Corte	Positivo	Negativo
4	PR	Corte	Positivo	Negativo
5	PR	Matriz	Positivo	Negativo
6	CE	Corte	Negativo	Negativo
7*	PR	Corte	Positivo	Positivo
8	NI	NI	Negativo	Negativo
9	SC	Avozeiro	Negativo	Negativo
10	SC	Avozeiro	Negativo	Negativo
11	RS	NI	Negativo	Negativo
12	RS	Avozeiro	Positivo	Negativo
13	RS	Corte	Negativo	Negativo
14	SC	Matriz	Positivo	Negativo
15	GO	Matriz	Positivo	Negativo
16	SC	Corte	Negativo	Negativo
17	NI	NI	Negativo	Negativo
18	NI	NI	Negativo	Negativo
19	PR	Matriz	Negativo	Negativo
20	SC	Matriz	Positivo	Negativo
21	BA	Corte	Negativo	Negativo
22*	PR	Corte	Negativo	Positivo
23	PR	Corte	Negativo	Negativo
24	PR	Corte	Negativo	Negativo
25	NI	NI	Negativo	Negativo
26	SC	Matriz	Negativo	Negativo
27	GO	Matriz	Negativo	Negativo
28*	NI	NI	Positivo	Positivo
29	NI	NI	Negativo	Negativo
30	SC	Matriz	Positivo	Negativo
31	NI	NI	Negativo	Negativo
32	SC	Matriz	Positivo	Negativo
33	NI	NI	Negativo	Negativo
34	SC	Matriz	Negativo	Negativo
35	GO	Matriz	Negativo	Negativo
36	NI	NI	Negativo	Negativo
37	GO	Matriz	Negativo	Negativo
38	GO	Matriz	Negativo	Negativo
39	SC	Matriz	Negativo	Negativo
40	NI	NI	Negativo	Negativo

41	NI	NI	Positivo	Negativo
42*	SP	Corte	Negativo	Positivo
43	NI	NI	Negativo	Positivo
44	NI	NI	Negativo	Negativo
45	PR	Corte	Negativo	Positivo
46	PR	Corte	Positivo	Negativo
47	PR	Corte	Negativo	Negativo
48	PR	Corte	Negativo	Positivo
49	PR	Corte	Negativo	Negativo
50	PR	Corte	Negativo	Positivo
51	PR	Corte	Negativo	Negativo
52	SP	Poedeira	Negativo	Negativo
53	SP	Matriz	Positivo	Negativo
54	SP	Matriz	Negativo	Negativo
55	RS	Matriz	Positivo	Negativo
56	RS	Matriz	Negativo	Positivo
57	RS	Matriz	Positivo	Negativo
58	NI	NI	Negativo	Negativo
59	NI	NI	Negativo	Positivo
60	SP	Corte	Negativo	Negativo
61	SP	Corte	Positivo	Negativo
62	SP	Corte	Negativo	Negativo
63	SP	Corte	Positivo	Negativo
64	SP	Corte	Positivo	Negativo
65*	PR	Corte	Positivo	Positivo
66	PR	Corte	Negativo	Negativo
67	PR	Corte	Negativo	Positivo
68	PR	Corte	Negativo	Negativo
69	PR	Corte	Negativo	Negativo
70	SP	Poedeira	Negativo	Negativo
71	SP	Poedeira	Positivo	Negativo
72	SP	Poedeira	Negativo	Negativo
73	SP	Poedeira	Negativo	Negativo
74	SP	Poedeira	Negativo	Negativo
75	SP	Poedeira	Negativo	Negativo
76	SP	Poedeira	Positivo	Negativo
77	SP	Poedeira	Positivo	Negativo
78	SP	Poedeira	Positivo	Negativo
79	SP	Poedeira	Positivo	Negativo
80	SP	Poedeira	Positivo	Negativo
81	SP	Poedeira	Negativo	Negativo
82	SP	Corte	Positivo	Negativo
83	SP	Corte	Positivo	Negativo
84	SP	Corte	Positivo	Negativo
85	SP	Corte	Negativo	Negativo

86	SP	Corte	Negativo	Negativo
87	SP	Corte	Positivo	Negativo
88	SP	Corte	Positivo	Negativo
89	SP	Corte	Negativo	Negativo
90	SP	Corte	Negativo	Negativo
91	SP	Corte	Negativo	Positivo
92	SP	Corte	Positivo	Negativo
93	SP	Corte	Negativo	Negativo
94	SP	Corte	Positivo	Negativo
95	SP	Corte	Negativo	Negativo
96	SP	Corte	Negativo	Negativo
97	SP	Corte	Positivo	Negativo
98	SP	Corte	Negativo	Negativo
99	SP	Corte	Negativo	Negativo
100	SP	Corte	Negativo	Negativo
101	SP	Corte	Positivo	Negativo
102	SP	Corte	Negativo	Negativo
103*	SP	Corte	Negativo	Positivo
104	SP	Corte	Negativo	Negativo
105	SP	Corte	Negativo	Negativo
106	SP	Corte	Negativo	Negativo
107	SP	Corte	Positivo	Negativo
108	SP	Corte	Positivo	Negativo
109	SP	Corte	Negativo	Negativo
110	SP	Corte	Negativo	Negativo
111	SP	Corte	Positivo	Negativo
112	RS	Corte	Negativo	Negativo
113	RS	Matriz	Negativo	Negativo
114	RS	Postura	Negativo	Negativo
115	RS	Corte	Negativo	Negativo
116	RS	Matriz	Negativo	Negativo
117*	RS	Corte	Negativo	Positivo
118	RS	Corte	Negativo	Negativo
119	RS	Corte	Negativo	Negativo
120	RS	Corte	Negativo	Negativo
121*	PE	Postura	Negativo	Positivo
122	RS	Corte	Negativo	Negativo
123	RS	Matriz	Negativo	Negativo
124	RS	Postura	Negativo	Negativo
125	PR	Postura	Negativo	Negativo
126	RS	Postura	Negativo	Negativo
127	PR	Corte	Negativo	Negativo
128	MG	Postura	Negativo	Negativo
129	PR	Corte	Negativo	Negativo
130	RS	NI	Negativo	Negativo

131	RS	Corte	Negativo	Negativo
132	RS	Postura	Negativo	Negativo
133	PR	Corte	Negativo	Negativo
134	RS	Postura	Negativo	Negativo
135	MS	Postura	Negativo	Negativo
136	PR	Corte	Negativo	Negativo
137	RS	Matriz	Negativo	Negativo
138	RS	Matriz	Negativo	Negativo
139	SP	Postura	Negativo	Negativo
140	RS	Matriz	Negativo	Negativo
141	RS	Corte	Negativo	Negativo
142	RS	Matriz	Negativo	Negativo
143	RS	Corte	Negativo	Negativo
144	PE	Corte	Negativo	Negativo
145	MT	Postura	Negativo	Negativo
146	PE	Postura	Negativo	Negativo
147	RS	Corte	Negativo	Negativo
148	RS	Corte	Negativo	Negativo
149	RS	Postura	Positivo	Negativo
150	RS	Postura	Negativo	Negativo
151	MS	Postura	Negativo	Negativo
152	RS	Postura	Negativo	Negativo
153	PE	Postura	Negativo	Negativo
154	RS	Postura	Negativo	Negativo
155	SP	Postura	Positivo	Negativo
156	RS	Postura	Negativo	Negativo
157	RS	Corte	Negativo	Negativo
158	MS	Postura	Negativo	Negativo
159	SP	Postura	Negativo	Negativo
160	RS	Postura	Negativo	Negativo
161	PE	Postura	Negativo	Negativo
162	RS	Corte	Negativo	Negativo
163	RS	Matriz	Negativo	Negativo
164	RS	Corte	Negativo	Negativo
165	PR	Corte	Negativo	Negativo
166	PE	Postura	Negativo	Negativo
167	RS	Postura	Negativo	Negativo
168	SP	Postura	Negativo	Negativo
169	SP	Postura	Negativo	Negativo
170	RS	Postura	Negativo	Negativo
171	PR	Postura	Negativo	Negativo
172	RS	Postura	Negativo	Negativo
173	RS	Matriz	Negativo	Negativo
174	RS	Matriz	Negativo	Negativo
175	PR	Corte	Negativo	Negativo

176	PE	Postura	Negativo	Negativo
177	RS	Postura	Negativo	Negativo
178	MS	Corte	Negativo	Negativo
179	MS	Postura	Negativo	Negativo
180	PR	Corte	Negativo	Negativo
181	PR	Corte	Negativo	Negativo
182	PR	Corte	Negativo	Negativo
183	RS	Matriz	Negativo	Negativo
184	MG	Corte	Negativo	Negativo
185	SC	Corte	Negativo	Negativo
186	PR	Corte	Negativo	Negativo
187	PR	Corte	Negativo	Negativo
188	NI	Codorna	Negativo	Negativo
189	SC	Corte	Negativo	Negativo
190	MS	Postura	Negativo	Negativo
191	RS	Corte	Negativo	Negativo
192	MS	Corte	Negativo	Negativo
193	PE	Matriz	Negativo	Negativo
194	PE	Matriz	Negativo	Negativo
195	SC	Matriz	Negativo	Negativo
196	PR	Corte	Negativo	Positivo
197	PR	Corte	Negativo	Positivo
198*	PR	Corte	Negativo	Positivo
199	MG	Matriz	Negativo	Negativo
200	NI	NI	Negativo	Negativo
201	MG	Poedeira	Negativo	Negativo
202	CE	Poedeira	Negativo	Negativo
203	NI	NI	Negativo	Negativo
204	NI	NI	Negativo	Negativo
205	NI	Corte	Negativo	Negativo
206	NI	Corte	Negativo	Negativo
207	SP	Poedeira	Negativo	Negativo
208	SP	Poedeira	Negativo	Negativo
209	MG	Poedeira	Negativo	Negativo
210	MG	Poedeira	Negativo	Negativo
211	MG	Corte	Negativo	Negativo
212	MG	Corte	Negativo	Negativo
213	PR	Corte	Negativo	Negativo
214	PR	Corte	Negativo	Negativo
215	NI	NI	Negativo	Negativo
216	NI	NI	Negativo	Positivo
217	NI	NI	Negativo	Positivo
218	NI	NI	Negativo	Negativo
219	NI	NI	Negativo	Negativo
220	NI	NI	Negativo	Negativo

221	GO	NI	Negativo	Negativo
222	NI	NI	Negativo	Negativo
223	NI	NI	Negativo	Negativo
224	NI	NI	Negativo	Negativo
225	NI	NI	Negativo	Negativo
226	MG	NI	Negativo	Negativo

FONTE: (BESERRA, 2017)

Legenda: NI= não identificado. *= Amostras nas quais os 11 segmentos foram amplificados/sequenciados

APÊNDICE A – Identificação das 10 amostras sequenciadas para os genes codificadores das proteínas virais (NSP1-5/VP1-3/VP4/VP6/VP7) e seus respectivos números de acesso disponíveis no *Genbank*

Amostra	Número de acesso										
	NSP1	NSP2	NSP3	NSP4	NSP5	VP1	VP2	VP3	VP4	VP6	VP7
1	KX185096	KX185116	KX198670	KX185126	KX863525	KX185106	KX198680	KX185136	KC962114	KX198690	KX859244
7	KX185097	KX185117	KX198671	KX185127	KX863526	KX185107	KX198681	KX185137	KC962115	KX198691	KC962122
22	KX185098	KX185118	KX198672	KX185128	KX863527	KX185108	KX198682	KX185138	KX865097	KX198692	KX859245
28	KX185099	KX185119	KX198673	KX185129	KX863528	KX185109	KX198683	KX185139	KX865098	KX198693	KX859246
42	KX1850100	KX185120	KX198674	KX185130	KX863529	KX185110	KX198684	KX185140	KX865099	KX198694	KX859247
65	KX1850101	KX185121	KX198675	KX185131	KX863530	KX185111	KX198685	KX185141	KC962117	KX198695	KC962123
103	KX1850102	KX185122	KX198676	KX185132	KX863531	KX185112	KX198686	KX185142	KC962118	KX198696	KX859248
117	KX1850103	KX185123	KX198677	KX185133	KX863532	KX185113	KX198687	KX185143	KX865100	KX198697	KX859249
121	KX1850104	KX185124	KX198678	KX185134	KX863533	KX185114	KX198688	KX185144	KX865101	KX198698	KX859250
198	KX1850105	KX185125	KX198679	KX185135	KX863534	KX185115	KX198689	KX185145	KX865102	KX198699	KX859251

APÊNDICE B – Matriz de similaridade nucleotídica da região consensual das sequências de rotavírus geradas neste estudo, frente às demais representativas do genótipo A16 (NSP1) depositadas no *Genbank*. Em destaque, os valores máximos e mínimos. São Paulo, 2017.

Seq->	02V0002G3	D62	10V0112H5	03V0002E10	Ch-1	1	7	22	28	42	65	103	117	121	198
02V0002G3	ID	0,911	0,883	0,897	0,899	0,894	0,896	0,9	0,895	0,896	0,894	0,886	0,896	0,898	0,896
D62	0,911 ID		0,882	0,894	0,901	0,885	0,887	0,89	0,89	0,9	0,885	0,884	0,891	0,893	0,896
10V0112H5	0,883	0,882 ID		0,889	0,938	0,869	0,874	0,875	0,87	0,885	0,87	0,87	0,874	0,876	0,878
03V0002E10	0,887	0,894	0,889 ID		0,905	0,886	0,893	0,896	0,891	0,953	0,893	0,887	0,891	0,893	0,887
Ch-1	0,899	0,901	0,938	0,905 ID		0,884	0,885	0,886	0,881	0,905	0,884	0,887	0,893	0,891	0,888
1	0,894	0,885	0,869	0,886	0,884 ID		0,962	0,963	0,954	0,893	0,959	0,967	0,977	0,98	0,955
7	0,896	0,887	0,874	0,893	0,885	0,962 ID		0,99	0,986	0,898	0,989	0,961	0,971	0,977	0,957
22	0,9	0,89	0,875	0,896	0,886	0,963	0,99 ID		0,984	0,902	0,99	0,964	0,972	0,974	0,959
28	0,895	0,89	0,87	0,891	0,881	0,954	0,986	0,984 ID		0,893	0,983	0,958	0,969	0,972	0,961
42	0,896	0,9	0,885	0,953	0,905	0,893	0,898	0,902	0,893 ID		0,898	0,895	0,894	0,896	0,897
65	0,894	0,885	0,87	0,893	0,884	0,959	0,989	0,99	0,983	0,898 ID		0,969	0,975	0,973	0,954
103	0,886	0,884	0,87	0,887	0,887	0,967	0,961	0,964	0,958	0,895	0,969 ID		0,985	0,984	0,952
117	0,896	0,891	0,874	0,891	0,893	0,977	0,971	0,972	0,969	0,894	0,975	0,985 ID	ID	0,992	0,957
121	0,898	0,893	0,876	0,893	0,891	0,98	0,977	0,974	0,972	0,896	0,973	0,984	0,992 ID		0,959
198	0,896	0,896	0,878	0,887	0,888	0,955	0,957	0,959	0,961	0,897	0,954	0,952	0,957	0,959 ID	

APÊNDICE C – Matriz de similaridade nucleotídica da região consensual das sequências de rotavírus geradas neste estudo, frente às demais representativas do genótipo N4 (NSP2) depositadas no *Genbank*. Em destaque, os valores máximos e mínimos. São Paulo, 2017.

Seq->	PO-13	03V0002E10	Ty-3	42
PO-13	ID	0,936	0,902	0,943
03V0002E10	0,936	ID	0,911	0,973
Ty-3	0,902	0,911	ID	0,917
42	0,943	0,973	0,917	ID

APÊNDICE D – Matriz de similaridade nucleotídica da região consensual das sequências de rotavírus geradas neste estudo, frente às demais representativas do genótipo N6 (NSP2) depositadas no *Genbank*. Em destaque, os valores máximos e mínimos. São Paulo, 2017.

Seq->	02V0002G3	Ch-1	1	7	22	28	65	103	117	121	198
02V0002G3	ID	0,959	0,869	0,861	0,858	0,851	0,865	0,873	0,865	0,867	0,873
Ch-1	0,959	ID	0,852	0,856	0,855	0,839	0,852	0,856	0,848	0,857	0,856
1	0,869	0,852	ID	0,938	0,946	0,951	0,947	0,982	0,964	0,964	0,983
7	0,861	0,856	0,938	ID	0,983	0,939	0,95	0,938	0,938	0,974	0,948
22	0,858	0,855	0,946	0,983	ID	0,947	0,96	0,948	0,946	0,968	0,951
28	0,851	0,839	0,951	0,939	0,947	ID	0,956	0,951	0,949	0,939	0,955
65	0,865	0,852	0,947	0,95	0,96	0,956	ID	0,953	0,962	0,951	0,95
103	0,873	0,856	0,982	0,938	0,948	0,951	0,953	ID	0,966	0,964	0,985
117	0,865	0,848	0,964	0,938	0,946	0,949	0,962	0,966	ID	0,964	0,965
121	0,867	0,857	0,964	0,974	0,968	0,939	0,951	0,964	0,964	ID	0,974
198	0,873	0,856	0,983	0,948	0,951	0,955	0,95	0,985	0,965	0,974	ID

APÊNDICE E – Matriz de similaridade nucleotídica da região consensual das sequências de rotavírus geradas neste estudo, frente às demais representativas do genótipo T4 (NSP3) depositadas no *Genbank*. Em destaque, os valores máximos e mínimos. São Paulo, 2017.

Seq->	PO-13	10V0112H5	03V0002E10	Ty-3	Ty-1	42
PO-13	ID	0,883	0,894	0,907	0,904	0,891
10V0112H5	0,883	ID	0,942	0,902	0,912	0,943
03V0002E10	0,894	0,942	ID	0,912	0,936	0,977
Ty-3	0,907	0,902	0,912	ID	0,914	0,915
Ty-1	0,904	0,912	0,936	0,914	ID	0,934
42	0,891	0,943	0,977	0,915	0,934	ID

APÊNDICE F – Matriz de similaridade nucleotídica da região consensual das sequências de rotavírus geradas neste estudo, frente às demais representativas do genótipo T8 (NSP3) depositadas no *Genbank*. Em destaque, os valores máximos e mínimos. São Paulo, 2017.

Seq->	02V0002G3	D62	Ch-1	1	7	22	28	65	103	117	121	198
02V0002G3	ID	0,906	0,928	0,904	0,902	0,901	0,902	0,897	0,897	0,897	0,902	0,904
D62	0,906	ID	0,913	0,889	0,889	0,881	0,889	0,885	0,885	0,885	0,889	0,889
Ch-1	0,928	0,913	ID	0,913	0,918	0,911	0,918	0,904	0,904	0,904	0,918	0,913
1	0,904	0,889	0,913	ID	0,943	0,936	0,943	0,915	0,915	0,915	0,943	1
7	0,902	0,889	0,918	0,943	ID	0,973	1	0,926	0,926	0,926	1	0,943
22	0,901	0,881	0,911	0,936	0,973	ID	0,973	0,925	0,925	0,925	0,973	0,936
28	0,902	0,889	0,918	0,943	1	0,973	ID	0,926	0,926	0,926	1	0,943
65	0,897	0,885	0,904	0,915	0,926	0,925	0,926	ID	1	1	0,926	0,915
103	0,897	0,885	0,904	0,915	0,926	0,925	0,926	1	ID	1	0,926	0,915
117	0,897	0,885	0,904	0,915	0,926	0,925	0,926	1	1	ID	0,926	0,915
121	0,902	0,889	0,918	0,943	1	0,973	1	0,926	0,926	0,926	ID	0,943
198	0,904	0,889	0,913	1	0,943	0,936	0,943	0,915	0,915	0,915	0,943	ID

APÊNDICE G – Matriz de similaridade nucleotídica da região consensual das sequências de rotavírus geradas neste estudo, frente às demais representativas do genótipo E4 (NSP4) depositadas no *Genbank*. Em destaque, os valores máximos e mínimos. São Paulo, 2017.

Seq->	PO-13	Ty-1	10V0112H5	42
PO-13	ID	0,924	0,912	0,922
Ty-1	0,924	ID	0,957	0,961
10V0112H5	0,912	0,957	ID	0,956
42	0,922	0,961	0,956	ID

APÊNDICE H – Matriz de similaridade nucleotídica da região consensual das sequências de rotavírus geradas neste estudo, frente às demais representativas do genótipo E10 (NSP4) depositadas no *Genbank*. Em destaque, os valores máximos e mínimos. São Paulo, 2017.

Seq>	Q200002G3	USP 534-6	USP391-2	USP372-2	AVE-85N	AVE-65	AVE-83A	AVE-87	AVE-100	Ch-1	AVE-82	USP 534-2	AVE-78	AVE-79	AVE-40N	AVE-39	AVE-66	AVE-97	AVE-73	AVE-84	AVE-33	ARV-2	AVE-40A	AVE-46A	AVE-86N	AVE-86A	1	7	22	28/et	65	103	117	121	198		
Q200002G3	ID	0.904	0.901	0.89	0.869	0.853	0.872	0.869	0.867	0.97	0.872	0.897	0.869	0.869	0.849	0.849	0.853	0.869	0.869	0.869	0.853	0.849	0.915	0.849	0.869	0.869	0.869	0.842	0.851	0.867	0.876	0.847	0.842	0.842	0.847	0.853	
USP 534-6	0.904	ID	0.876	0.865	0.867	0.865	0.858	0.867	0.865	0.908	0.865	0.977	0.863	0.863	0.86	0.84	0.856	0.867	0.867	0.867	0.849	0.855	0.892	0.84	0.867	0.867	0.849	0.847	0.842	0.865	0.865	0.849	0.849	0.849	0.849	0.856	
USP391-2	0.911	0.876	ID	0.908	0.867	0.863	0.86	0.867	0.864	0.904	0.865	0.865	0.867	0.867	0.86	0.86	0.863	0.867	0.867	0.867	0.849	0.856	0.896	0.904	0.86	0.867	0.867	0.851	0.847	0.842	0.86	0.865	0.851	0.851	0.851	0.847	
USP372-2	0.89	0.865	0.908	ID	0.856	0.851	0.849	0.856	0.856	0.892	0.858	0.853	0.855	0.856	0.849	0.849	0.851	0.856	0.856	0.844	0.844	0.892	0.849	0.856	0.856	0.84	0.835	0.849	0.849	0.853	0.84	0.84	0.84	0.84	0.84	0.837	
AVE-85N	0.869	0.867	0.867	0.865	ID	0.952	0.936	0.997	0.995	0.867	0.995	0.858	0.993	0.993	0.993	0.952	0.952	0.952	0.997	0.993	0.938	0.947	0.881	0.952	0.997	0.997	0.945	0.949	0.965	0.94	0.954	0.945	0.945	0.945	0.954	0.952	
AVE-85N	0.869	0.867	0.867	0.865	ID	0.952	0.936	0.997	0.995	0.867	0.995	0.858	0.993	0.993	0.993	0.952	0.952	0.952	0.997	0.993	0.938	0.947	0.881	0.952	0.997	0.997	0.945	0.949	0.965	0.94	0.954	0.945	0.945	0.945	0.954	0.952	
AVE-65	0.853	0.856	0.863	0.851	0.952	ID	0.922	0.954	0.952	0.858	0.952	0.851	0.949	0.949	0.942	0.942	1	0.954	0.949	0.952	0.94	0.878	0.942	0.954	0.954	0.965	0.945	0.952	0.926	0.954	0.945	0.945	0.945	0.965	0.965	0.942	
AVE-83A	0.872	0.858	0.86	0.849	0.936	0.922	ID	0.936	0.933	0.881	0.933	0.858	0.931	0.931	0.924	0.924	0.922	0.936	0.936	0.92	0.92	0.888	0.924	0.936	0.936	0.92	0.926	0.94	0.99	0.929	0.92	0.92	0.929	0.929	0.931		
AVE-87	0.869	0.867	0.867	0.856	0.997	0.954	0.936	ID	0.997	0.867	0.997	0.858	0.995	0.995	0.952	0.952	0.954	1	0.995	0.961	0.949	0.881	0.952	1	1	0.947	0.949	0.965	0.94	0.954	0.947	0.947	0.947	0.947	0.954	0.952	
AVE-100	0.867	0.865	0.867	0.856	0.995	0.952	0.933	0.997	ID	0.865	0.995	0.855	0.993	0.993	0.952	0.952	0.952	0.997	0.993	0.933	0.949	0.878	0.952	0.997	0.997	0.945	0.947	0.963	0.938	0.952	0.945	0.945	0.945	0.952	0.949		
Ch-1	0.97	0.908	0.904	0.892	0.867	0.858	0.881	0.867	0.865	ID	0.869	0.94	0.867	0.867	0.844	0.844	0.858	0.867	0.867	0.849	0.84	0.922	0.844	0.867	0.867	0.87	0.851	0.872	0.88	0.847	0.847	0.847	0.847	0.847	0.853		
USP 534-2	0.897	0.877	0.865	0.869	0.838	0.995	0.952	0.933	0.997	0.995	0.869	ID	0.856	0.997	0.997	0.949	0.949	0.952	0.997	0.993	0.938	0.947	0.883	0.949	0.997	0.997	0.945	0.947	0.963	0.938	0.952	0.945	0.945	0.952	0.949		
AVE-82	0.872	0.865	0.863	0.858	0.851	0.858	0.858	0.856	0.904	0.856	ID	0.853	0.853	0.853	0.835	0.835	0.851	0.858	0.858	0.844	0.831	0.89	0.835	0.858	0.858	0.844	0.837	0.856	0.947	0.963	0.856	0.844	0.844	0.844	0.844	0.847	
AVE-78	0.869	0.863	0.867	0.856	0.993	0.949	0.931	0.995	0.993	0.867	0.997	0.833	ID	0.995	0.947	0.947	0.949	0.995	0.99	0.956	0.945	0.881	0.947	0.995	0.995	0.942	0.945	0.961	0.936	0.949	0.942	0.942	0.942	0.949	0.947		
AVE-79	0.869	0.863	0.867	0.856	0.993	0.949	0.931	0.995	0.993	0.867	0.997	0.833	0.995	ID	0.947	0.947	0.949	0.995	0.99	0.956	0.945	0.881	0.947	0.995	0.995	0.942	0.945	0.961	0.936	0.949	0.942	0.942	0.942	0.949	0.947		
AVE-40N	0.849	0.84	0.86	0.849	0.952	0.942	0.924	0.952	0.952	0.844	0.949	0.835	0.947	0.947	ID	1	0.942	0.952	0.947	0.968	0.993	0.865	1	0.952	0.952	0.952	0.926	0.945	0.945	0.945	0.924	0.94	0.926	0.926	0.94	0.936	
AVE-39	0.849	0.84	0.86	0.849	0.952	0.942	0.924	0.952	0.952	0.844	0.949	0.835	0.947	0.947	1	ID	0.942	0.952	0.947	0.968	0.993	0.865	1	0.952	0.952	0.952	0.926	0.945	0.945	0.945	0.924	0.94	0.926	0.926	0.94	0.936	
AVE-66	0.853	0.856	0.863	0.851	0.952	1	0.922	0.954	0.952	0.858	0.952	0.851	0.949	0.949	0.942	0.942	ID	0.954	0.949	0.952	0.94	0.878	0.942	0.954	0.954	0.965	0.945	0.952	0.926	0.954	0.945	0.945	0.965	0.965	0.942		
AVE-97	0.869	0.867	0.867	0.856	0.997	0.954	0.936	1	0.997	0.867	0.997	0.858	0.995	0.995	0.952	0.952	0.954	ID	0.995	0.961	0.949	0.881	0.952	1	1	0.947	0.949	0.965	0.94	0.954	0.947	0.947	0.947	0.947	0.954	0.952	
AVE-73	0.869	0.867	0.867	0.856	0.993	0.949	0.936	0.995	0.993	0.867	0.993	0.858	0.99	0.99	0.947	0.947	0.949	0.995	ID	0.956	0.945	0.881	0.947	0.995	0.995	0.947	0.945	0.965	0.94	0.949	0.947	0.947	0.947	0.947	0.947		
AVE-84	0.853	0.849	0.856	0.844	0.958	0.952	0.92	0.961	0.958	0.849	0.958	0.844	0.956	0.956	0.968	0.968	0.952	0.961	0.956	ID	0.965	0.865	0.968	0.961	0.961	0.961	0.942	0.952	0.954	0.924	0.947	0.942	0.942	0.942	0.947	0.947	
AVE-33	0.849	0.835	0.856	0.844	0.947	0.94	0.92	0.949	0.949	0.84	0.947	0.831	0.945	0.945	0.993	0.993	0.94	0.949	0.945	0.965	ID	0.86	0.993	0.949	0.949	0.949	0.924	0.938	0.938	0.92	0.938	0.924	0.924	0.924	0.938	0.929	
ARV-2	0.915	0.892	0.904	0.892	0.881	0.878	0.888	0.881	0.878	0.922	0.883	0.89	0.881	0.881	0.865	0.865	0.878	0.881	0.881	0.947	0.968	0.993	0.865	ID	0.952	0.952	0.952	0.963	0.867	0.878	0.892	0.858	0.863	0.863	0.863	0.874	0.874
AVE-40A	0.849	0.84	0.86	0.849	0.952	0.942	0.924	0.952	0.952	0.844	0.949	0.835	0.947	0.947	1	1	0.942	0.952	0.947	0.968	0.993	0.865	ID	0.952	0.952	0.952	0.926	0.945	0.945	0.945	0.924	0.94	0.926	0.926	0.94	0.936	
AVE-46A	0.869	0.867	0.867	0.856	0.997	0.954	0.936	1	0.997	0.867	0.997	0.858	0.995	0.995	0.952	0.952	0.954	1	0.995	0.961	0.949	0.881	0.952	ID	1	0.947	0.949	0.965	0.94	0.954	0.947	0.947	0.947	0.947	0.954	0.952	
AVE-86N	0.869	0.867	0.867	0.856	0.997	0.954	0.936	1	0.997	0.867	0.997	0.858	0.995	0.995	0.952	0.952	0.954	1	0.995	0.961	0.949	0.881	0.952	1	ID	0.947	0.949	0.965	0.94	0.954	0.947	0.947	0.947	0.947	0.954	0.952	
AVE-86A	0.869	0.867	0.867	0.856	0.997	0.954	0.936	1	0.997	0.867	0.997	0.858	0.995	0.995	0.952	0.952	0.954	1	0.995	0.961	0.949	0.881	0.952	1	ID	0.947	0.949	0.965	0.94	0.954	0.947	0.947	0.947	0.947	0.954	0.952	
1	0.842	0.849	0.851	0.84	0.945	0.865	0.92	0.947	0.945	0.847	0.945	0.844	0.942	0.942	0.926	0.926	0.965	0.947	0.947	0.942	0.942	0.863	0.926	0.947	0.947	ID	0.956	0.949	0.924	0.947	1	1	0.947	0.936			
7	0.851	0.842	0.847	0.835	0.949	0.945	0.926	0.949	0.947	0.851	0.947	0.837	0.945	0.945	0.945	0.945	0.945	0.949	0.945	0.952	0.938	0.867	0.945	0.965	0.965	0.949	0.947	ID	0.947	0.926	0.945	0.956	0.945	0.945	0.947		
22	0.867	0.865	0.86	0.849	0.965	0.952	0.94	0.965	0.963	0.872	0.963	0.856	0.961	0.961	0.945	0.945	0.952	0.965	0.965	0.954	0.938	0.878	0.945	0.965	0.965	0.949	0.947	ID	0.945	0.965	0.949	0.949	0.965	0.958			
28	0.876	0.865	0.865	0.853	0.94	0.926	0.99	0.94	0.938	0.89	0.938	0.86	0.936	0.936	0.924	0.924	0.926	0.94	0.94	0.924	0.92	0.892	0.924	0.94	0.94	0.94	0.924	0.926	0.945	ID	0.929	0.924	0.924	0.929	0.931		
65	0.847	0.849	0.851	0.84	0.954	0.954	0.929	0.954	0.9																												

APÊNDICE I – Matriz de similaridade nucleotídica da região consensual das sequências de rotavírus geradas neste estudo, frente às demais representativas do genótipo H4 (NSP5) depositadas no *Genbank*. Em destaque, os valores máximos e mínimos. São Paulo, 2017.

Seq->	PO-13	Ch-2	03V0002E10	03V0001E10	10V0112H5	Ty-1	42
PO-13	ID	0,937	0,933	0,933	0,942	0,939	0,927
Ch-2	0,937	ID	0,953	0,953	0,93	0,92	0,959
03V0002E10	0,933	0,953	ID	0,996	0,927	0,916	0,968
03V0001E10	0,933	0,953	0,996	ID	0,927	0,916	0,968
10V0112H5	0,942	0,93	0,927	0,927	ID	0,927	0,913
Ty-1	0,939	0,92	0,916	0,916	0,927	ID	0,914
42	0,927	0,959	0,968	0,968	0,913	0,914	ID

APÊNDICE J – Matriz de similaridade nucleotídica da região consensual das sequências de rotavírus geradas neste estudo, frente às demais representativas do genótipo H8 (NSP5) depositadas no *Genbank*. Em destaque, os valores máximos e mínimos. São Paulo, 2017.

Seq->	02V0002G33	Ch-03V0158G3	Ch-04V0027G6	Ch-03V0358F3	Ch-06V0661	Ch-1	1	7	22	28	65	103	117	121	198
02V0002G3	ID	1	0,998	0,998	0,95	0,953	0,912	0,908	1	0,907	0,903	0,99	0,908	0,953	0,903
Ch-03V0158G3	1	ID	0,998	0,998	0,95	0,953	0,912	0,908	1	0,907	0,903	0,99	0,908	0,953	0,903
Ch-04V0027G6	0,998	0,998	ID	0,996	0,948	0,951	0,91	0,907	0,998	0,905	0,902	0,988	0,907	0,951	0,902
Ch-03V0358F3	0,998	0,998	0,996	ID	0,948	0,951	0,91	0,907	0,998	0,905	0,902	0,988	0,907	0,951	0,902
Ch-06V0661	0,95	0,95	0,948	0,948	ID	0,946	0,912	0,912	0,95	0,907	0,907	0,943	0,912	0,946	0,907
Ch-1	0,953	0,953	0,951	0,951	0,946	ID	0,907	0,907	0,953	0,902	0,902	0,95	0,907	1	0,902
1	0,912	0,912	0,91	0,91	0,912	0,907	ID	0,996	0,912	0,985	0,988	0,922	0,996	0,907	0,988
7	0,908	0,908	0,907	0,907	0,912	0,907	0,996	ID	0,908	0,988	0,991	0,918	1	0,907	0,991
22	1	1	0,998	0,998	0,95	0,953	0,912	0,908	ID	0,907	0,903	0,99	0,908	0,953	0,903
28	0,907	0,907	0,905	0,905	0,907	0,902	0,985	0,988	0,907	ID	0,996	0,91	0,988	0,902	0,996
65	0,903	0,903	0,902	0,902	0,907	0,902	0,988	0,991	0,903	0,996	ID	0,913	0,991	0,902	1
103	0,99	0,99	0,988	0,988	0,943	0,95	0,922	0,918	0,99	0,91	0,913	ID	0,918	0,95	0,913
117	0,908	0,908	0,907	0,907	0,912	0,907	0,996	1	0,908	0,988	0,991	0,918	ID	0,907	0,991
121	0,953	0,953	0,951	0,951	0,946	1	0,907	0,907	0,953	0,902	0,902	0,95	0,907	ID	0,902
198	0,903	0,903	0,902	0,902	0,907	0,902	0,988	0,991	0,903	0,996	1	0,913	0,991	0,902	ID

APÊNDICE K – Matriz de similaridade nucleotídica da região consensual das sequências de rotavírus geradas neste estudo, frente às demais representativas do genótipo R4 (VP1) depositadas no *Genbank*. Em destaque, os valores máximos e mínimos. São Paulo, 2017.

Seq->	PO-13	Ty-3	Ty-1	10V0112H5	03V0002E10	AROVP1	42
PO-13	ID	0,92	0,908	0,94	0,899	0,919	0,909
Ty-3	0,92	ID	0,94	0,908	0,924	0,884	0,938
Ty-1	0,908	0,94	ID	0,904	0,927	0,886	0,964
10V0112H5	0,94	0,908	0,904	ID	0,887	0,922	0,9
03V0002E10	0,899	0,924	0,927	0,887	ID	0,883	0,926
AROVP1	0,919	0,884	0,886	0,922	0,883	ID	0,891
42	0,909	0,938	0,964	0,9	0,926	0,891	ID

APÊNDICE L – Matriz de similaridade nucleotídica da região consensual das sequências de rotavírus geradas neste estudo, frente às demais representativas do genótipo R6 (VP1) depositadas no *Genbank*. Em destaque, os valores máximos e mínimos. São Paulo, 2017.

Seq->	02V0002G3	D62	Ch-1	1	7	22	28	65	103	117	121	198
02V0002G3	ID	0,907	0,933	0,903	0,903	0,904	0,9	0,901	0,899	0,9	0,903	0,9
D62	0,907	ID	0,939	0,888	0,891	0,894	0,892	0,888	0,887	0,893	0,892	0,894
Ch-1	0,933	0,939	ID	0,903	0,907	0,91	0,908	0,903	0,905	0,906	0,908	0,909
1	0,903	0,888	0,903	ID	0,97	0,964	0,936	0,964	0,971	0,935	0,971	0,941
7	0,903	0,891	0,907	0,97	ID	0,981	0,933	0,965	0,96	0,938	0,999	0,943
22	0,904	0,894	0,91	0,964	0,981	ID	0,938	0,959	0,957	0,937	0,982	0,946
28	0,9	0,892	0,908	0,936	0,933	0,938	ID	0,954	0,932	0,96	0,934	0,966
65	0,901	0,888	0,903	0,964	0,965	0,959	0,954	ID	0,957	0,943	0,964	0,948
103	0,899	0,887	0,905	0,971	0,96	0,957	0,932	0,957	ID	0,93	0,96	0,932
117	0,9	0,893	0,906	0,935	0,938	0,937	0,96	0,943	0,93	ID	0,939	0,958
121	0,903	0,892	0,908	0,971	0,999	0,982	0,934	0,964	0,96	0,939	ID	0,944
198	0,9	0,894	0,909	0,941	0,943	0,946	0,966	0,948	0,932	0,958	0,944	ID

APÊNDICE M – Matriz de similaridade nucleotídica da região consensual das sequências de rotavírus geradas neste estudo, frente às demais representativas do genótipo C4 (VP2) depositadas no *Genbank*. Em destaque, os valores máximos e mínimos. São Paulo, 2017.

Seq->	PO-13	10V0112H5	03V0002E10	Ty-3	Ty-1	AROVP2	42
PO-13	ID	0,899	0,842	0,861	0,849	0,896	0,853
10V0112H5	0,899	ID	0,85	0,853	0,846	0,87	0,852
03V0002E10	0,842	0,85	ID	0,867	0,95	0,821	0,948
Ty-3	0,861	0,853	0,867	ID	0,859	0,852	0,856
Ty-1	0,849	0,846	0,95	0,859	ID	0,817	0,961
AROVP2	0,896	0,87	0,821	0,852	0,817	ID	0,82
42	0,853	0,852	0,948	0,856	0,961	0,82	ID

APÊNDICE N – Matriz de similaridade nucleotídica da região consensual das sequências de rotavírus geradas neste estudo, frente às demais representativas do genótipo C6 (VP2) depositadas no *Genbank*. Em destaque, os valores máximos e mínimos. São Paulo, 2017.

Seq->	D62	Ch-1	1	7	22	28	65	103	117	121	198
D62	ID	0,93	0,905	0,904	0,905	0,888	0,908	0,913	0,901	0,904	0,882
Ch-1	0,93	ID	0,918	0,916	0,917	0,905	0,917	0,924	0,913	0,916	0,903
1	0,905	0,918	ID	0,965	0,963	0,913	0,955	0,955	0,959	0,965	0,903
7	0,904	0,916	0,965	ID	0,995	0,908	0,966	0,96	0,962	1	0,901
22	0,905	0,917	0,963	0,995	ID	0,907	0,968	0,965	0,96	0,995	0,9
28	0,888	0,905	0,913	0,908	0,907	ID	0,898	0,908	0,911	0,908	0,975
65	0,908	0,917	0,955	0,966	0,968	0,898	ID	0,953	0,958	0,966	0,892
103	0,913	0,924	0,955	0,96	0,965	0,908	0,953	ID	0,955	0,96	0,901
117	0,901	0,913	0,959	0,962	0,96	0,911	0,958	0,955	ID	0,962	0,904
121	0,904	0,916	0,965	1	0,995	0,908	0,966	0,96	0,962	ID	0,901
198	0,882	0,903	0,903	0,901	0,9	0,975	0,892	0,901	0,904	0,901	ID

APÊNDICE O - Matriz de similaridade nucleotídica da região consensual das sequências de rotavírus geradas neste estudo, frente às demais representativas do genótipo M4 (VP3) depositadas no *Genbank*. Em destaque, os valores máximos e mínimos. São Paulo, 2017.

Seq->	PO-13	CH2	10V0112H5	03V0002E10	AROVP3	42
PO-13	ID	0,917	0,937	0,898	0,909	0,909
CH2	0,917	ID	0,915	0,934	0,89	0,963
10V0112H5	0,937	0,915	ID	0,896	0,909	0,914
03V0002E10	0,898	0,934	0,896	ID	0,882	0,923
AROVP3	0,909	0,89	0,909	0,882	ID	0,887
42	0,909	0,963	0,914	0,923	0,887	ID

APÊNDICE P - Matriz de similaridade nucleotídica da região consensual das sequências de rotavírus geradas neste estudo, frente às demais representativas do genótipo M7 (VP3) depositadas no *Genbank*. Em destaque, os valores máximos e mínimos. São Paulo, 2017.

Seq->	02V0002G3	D62	1	7	22	28	65	103	117	121	191
02V0002G3	ID	0,917	0,894	0,888	0,889	0,88	0,885	0,883	0,888	0,886	0,887
D62	0,917	ID	0,894	0,891	0,891	0,877	0,889	0,871	0,894	0,891	0,892
1	0,894	0,894	ID	0,992	0,969	0,904	0,958	0,877	0,965	0,982	0,972
7	0,888	0,891	0,992	ID	0,966	0,901	0,953	0,876	0,962	0,986	0,969
22	0,889	0,891	0,969	0,966	ID	0,922	0,983	0,87	0,958	0,958	0,978
28	0,88	0,877	0,904	0,901	0,922	ID	0,919	0,931	0,9	0,897	0,914
65	0,885	0,889	0,958	0,953	0,983	0,919	ID	0,869	0,968	0,966	0,966
103	0,883	0,871	0,877	0,876	0,87	0,931	0,869	ID	0,871	0,872	0,875
117	0,888	0,894	0,965	0,962	0,958	0,9	0,968	0,871	ID	0,975	0,958
121	0,886	0,891	0,982	0,986	0,958	0,897	0,966	0,872	0,975	ID	0,958
191	0,887	0,892	0,972	0,969	0,978	0,914	0,966	0,875	0,958	0,958	ID

APÊNDICE Q – Matriz de similaridade nucleotídica da região consensual das sequências de rotavírus geradas neste estudo, frente às demais representativas do genótipo P[31] (VP4) depositadas no *Genbank*. Em destaque, os valores máximos e mínimos. São Paulo, 2017.

Seq->	06V0661	D62	1	7	22	28	42	65	103	117	121	191
06V0661	ID	0,827	0,893	0,812	0,881	0,891	0,893	0,808	0,883	0,883	0,893	0,891
D62	0,827	ID	0,805	0,852	0,812	0,803	0,805	0,856	0,813	0,813	0,805	0,803
1	0,893	0,805	ID	0,815	0,944	0,954	1	0,807	0,942	0,942	1	0,954
7	0,812	0,852	0,815	ID	0,812	0,82	0,815	0,969	0,81	0,81	0,815	0,82
22	0,881	0,812	0,944	0,812	ID	0,962	0,944	0,805	0,998	0,998	0,944	0,962
28	0,891	0,803	0,954	0,82	0,962	ID	0,954	0,813	0,961	0,961	0,954	1
42	0,893	0,805	1	0,815	0,944	0,954	ID	0,807	0,942	0,942	1	0,954
65	0,808	0,856	0,807	0,969	0,805	0,813	0,807	ID	0,803	0,803	0,807	0,813
103	0,883	0,813	0,942	0,81	0,998	0,961	0,942	0,803	ID	1	0,942	0,961
117	0,883	0,813	0,942	0,81	0,998	0,961	0,942	0,803	1	ID	0,942	0,961
121	0,893	0,805	1	0,815	0,944	0,954	1	0,807	0,942	0,942	ID	0,954
191	0,891	0,803	0,954	0,82	0,962	1	0,954	0,813	0,961	0,961	0,954	ID

APÊNDICE R – Matriz de similaridade nucleotídica da região consensual das sequências de rotavírus geradas neste estudo, frente às demais representativas do genótipo I4 (VP6) depositadas no *Genbank*. Em destaque, os valores máximos e mínimos. São Paulo, 2017.

Seq->	PO-13	Ch-2	03V0002E10	03V0001E10	Ty-1	Ty-3	CH2	10V0112H5	03V0002E10	42
PO-13	ID	0,927	0,93	0,923	0,932	0,926	0,925	0,925	0,93	0,923
Ch-2	0,927	ID	0,932	0,928	0,936	0,965	0,994	0,916	0,936	0,968
03V0002E10	0,93	0,932	ID	0,983	0,971	0,933	0,931	0,922	0,991	0,931
03V0001E10	0,923	0,928	0,983	ID	0,968	0,929	0,926	0,918	0,988	0,927
Ty-1	0,932	0,936	0,971	0,968	ID	0,936	0,936	0,93	0,979	0,936
Ty-3	0,926	0,965	0,933	0,929	0,936	ID	0,965	0,921	0,938	0,979
CH2	0,925	0,994	0,931	0,926	0,936	0,965	ID	0,916	0,936	0,968
10V0112H5	0,925	0,916	0,922	0,918	0,93	0,921	0,916	ID	0,927	0,917
03V0002E10	0,93	0,936	0,991	0,988	0,979	0,938	0,936	0,927	ID	0,937
42	0,923	0,968	0,931	0,927	0,936	0,979	0,968	0,917	0,937	ID

APÊNDICE S – Matriz de similaridade nucleotídica da região consensual das sequências de rotavírus geradas neste estudo, frente às demais representativas do genótipo I11 (VP6) depositadas no *Genbank*. Em destaque, os valores máximos e mínimos. São Paulo, 2017.

Seq->	02V0002G3	ADL102655-2	ADL102655-2	Ch-03V0158G3	Ch-06V0661	Ch-03V0358F3	Ch-04V0027G6	AVRV	02V0002G3	AVRV	1	7	22	28	65	103	117	121	198
02V0002G3	ID	0,96	0,982	0,962	0,964	0,981	0,996	0,953	0,996	0,96	0,936	0,937	0,931	0,929	0,939	0,934	0,93	0,937	0,937
ADL102655-2	0,96	ID	0,962	0,946	0,946	0,96	0,964	0,949	0,964	1	0,934	0,935	0,93	0,929	0,936	0,932	0,925	0,935	0,936
Ch-03V0158G3	0,982	0,962	ID	0,971	0,971	0,997	0,978	0,955	0,978	0,962	0,94	0,937	0,932	0,934	0,94	0,935	0,931	0,937	0,938
Ch-06V0661	0,964	0,946	0,946	ID	ID	0,968	0,966	0,943	0,966	0,946	0,924	0,925	0,92	0,92	0,926	0,926	0,924	0,925	0,924
Ch-03V0358F3	0,981	0,96	0,997	0,968	0,968	ID	0,977	0,954	0,977	0,96	0,939	0,937	0,931	0,933	0,939	0,934	0,93	0,937	0,937
Ch-04V0027G6	0,996	0,964	0,978	0,966	0,966	0,977	ID	0,953	1	0,964	0,937	0,937	0,933	0,93	0,938	0,935	0,931	0,937	0,937
AVRV	0,953	0,949	0,955	0,943	0,943	0,954	0,953	ID	0,953	0,949	0,937	0,942	0,93	0,935	0,937	0,943	0,939	0,942	0,936
02V0002G3	0,996	0,964	0,978	0,966	0,966	0,977	1	0,953	ID	0,964	0,937	0,937	0,933	0,93	0,938	0,935	0,931	0,937	0,937
AVRV-2	0,96	1	0,962	0,946	0,946	0,96	0,964	0,949	0,964	ID	0,934	0,935	0,93	0,929	0,936	0,932	0,925	0,935	0,936
1	0,936	0,934	0,94	0,924	0,924	0,939	0,937	0,937	0,937	0,935	0,966	ID	0,984	0,961	0,979	0,978	0,976	1	0,974
7	0,937	0,935	0,937	0,925	0,925	0,937	0,937	0,942	0,937	0,935	0,966	ID	0,984	0,961	0,979	0,978	0,976	0,966	0,968
22	0,931	0,93	0,932	0,92	0,92	0,931	0,933	0,93	0,933	0,93	0,953	0,984	ID	0,949	0,965	0,964	0,961	0,984	0,96
28	0,929	0,929	0,934	0,926	0,926	0,939	0,93	0,935	0,93	0,929	0,969	0,961	0,949	ID	0,966	0,963	0,965	0,961	0,964
65	0,939	0,936	0,94	0,926	0,926	0,939	0,938	0,937	0,938	0,936	0,972	0,979	0,965	0,966	ID	0,972	0,966	0,979	0,982
103	0,934	0,932	0,935	0,926	0,926	0,934	0,935	0,943	0,935	0,932	0,969	0,978	0,964	0,963	0,972	ID	0,979	0,978	0,967
117	0,93	0,925	0,931	0,924	0,924	0,93	0,931	0,939	0,931	0,925	0,96	0,976	0,961	0,965	0,966	0,979	ID	0,976	0,96
121	0,937	0,935	0,937	0,925	0,925	0,937	0,937	0,942	0,937	0,935	0,966	1	0,984	0,961	0,979	0,978	0,976	ID	0,974
198	0,937	0,936	0,938	0,924	0,924	0,937	0,937	0,936	0,937	0,936	0,968	0,974	0,96	0,964	0,982	0,967	0,96	0,974	ID

APÊNDICE T – Matriz de similaridade nucleotídica da região consensual das sequências de rotavírus geradas neste estudo, frente às demais representativas do genótipo G19 (VP7) depositadas no *Genbank*. Em destaque, os valores máximos e mínimos demonstrados no texto. São Paulo, 2017.

Seq->	02V002G3	D62	Ch-06V0661	Ch-04V0027G6	Ch-03V0358F3	Ch-03V0158G3	AvRV-2	Ch-1	1	7	22	28	42	65	103	117	121	198
02V002G3	ID	0,939	0,975	0,997	0,933	0,935	0,938	0,949	0,932	0,928	0,925	0,928	0,906	0,929	0,917	0,932	0,928	0,929
D62	0,939	ID	0,935	0,939	0,938	0,939	0,966	0,946	0,935	0,93	0,926	0,939	0,906	0,928	0,935	0,935	0,93	0,928
Ch-06V0661	0,975	ID	ID	0,978	0,932	0,933	0,933	0,945	0,928	0,926	0,915	0,926	0,906	0,919	0,92	0,928	0,926	0,919
Ch-04V0027G6	0,997	0,939	0,978	ID	0,936	0,938	0,938	0,952	0,935	0,928	0,928	0,928	0,909	0,932	0,917	0,935	0,928	0,932
Ch-03V0358F3	0,933	0,938	0,932	0,936	ID	0,995	0,939	0,942	0,928	0,929	0,922	0,932	0,905	0,915	0,928	0,928	0,929	0,915
Ch-03V0158G3	0,935	0,939	0,933	0,938	0,995	ID	0,941	0,943	0,929	0,93	0,923	0,933	0,906	0,916	0,929	0,929	0,93	0,916
AvRV-2	0,938	0,966	0,933	0,938	0,939	0,941	ID	0,942	0,936	0,935	0,93	0,935	0,915	0,932	0,93	0,936	0,935	0,932
Ch-1	0,949	0,946	0,945	0,952	0,942	0,943	0,942	ID	0,948	0,946	0,925	0,955	0,916	0,926	0,942	0,948	0,946	0,926
AROV7	0,673	0,682	0,679	0,676	0,684	0,684	0,68	0,684	0,68	0,694	0,696	0,686	0,69	0,694	0,694	0,68	0,694	0,694
1	0,932	0,935	0,928	0,935	0,928	0,929	0,936	0,948	ID	0,955	0,933	0,961	0,961	0,935	0,948	1	0,955	0,935
7	0,928	0,93	0,926	0,928	0,929	0,93	0,935	0,946	0,955	ID	0,935	0,959	0,923	0,933	0,958	0,955	1	0,933
22	0,925	0,926	0,915	0,928	0,922	0,923	0,93	0,925	0,933	0,935	ID	0,932	0,909	0,932	0,93	0,933	0,935	0,992
28	0,928	0,939	0,926	0,928	0,932	0,933	0,935	0,955	0,961	0,959	0,932	ID	0,932	0,933	0,955	0,961	0,959	0,933
42	0,906	0,906	0,906	0,909	0,905	0,906	0,915	0,916	0,961	0,923	0,909	0,932	ID	0,913	0,915	0,961	0,923	0,913
65	0,929	0,928	0,919	0,932	0,915	0,916	0,932	0,926	0,935	0,933	0,992	0,933	0,913	ID	0,932	0,935	0,933	1
103	0,917	0,935	0,92	0,917	0,928	0,929	0,93	0,942	0,948	0,958	0,93	0,955	0,915	0,932	ID	0,948	0,958	0,932
117	0,932	0,935	0,928	0,935	0,928	0,929	0,936	0,948	1	0,955	0,933	0,961	0,961	0,935	0,948	ID	0,955	0,935
121	0,928	0,93	0,926	0,928	0,929	0,93	0,935	0,946	0,955	1	0,935	0,959	0,923	0,933	0,958	0,955	ID	0,933
198	0,929	0,928	0,919	0,932	0,915	0,916	0,932	0,926	0,935	0,933	0,992	0,933	0,913	1	0,932	0,935	0,933	ID