FERNANDA DORNELAS FLORENTINO SILVA

Análise multigênica de rotavírus do grupo A em suínos

São Paulo

2016

FERNANDA DORNELAS FLORENTINO SILVA

Análise multigênica de rotavírus do grupo A em suínos

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

2016

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

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

T.3276
FMVZ

Silva, Fernanda Dornelas Florentino
Análise multigênica de rotavírus do grupo A em suínos / Fernanda Dornelas Florentino
Silva. -- 2016.
127 f. il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde animal, São Paulo, 2016.

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

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Fabio Gregori.

1. Grupo A de rotavírus. 2. Sequenciamento genômico completo. 3. Suínos.
4. Constelações. 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 rotavirus do grupo A em suínos", protocolado sob o nº 2478/2011, utilizando 100 (cem) suínos, sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. Fábio Gregory, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 7/12/2011.

We certify that the Research "Multigenic analysis of porcine group A rotavirus", protocol number 2478/2011, utilizing 100 (one hundred) pigs, under the responsibility Prof. Dr. Fábio Gregory, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 12/7/2011.

São Paulo, 8 de dezembro de 2011.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: SILVA, Fernanda Dornelas Florentino

Título: **Análise multigênica de rotavírus do grupo A em suínos**

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

Ao meu pai, prof. Dr. Ernani Clarete da Silva, que dignamente me ensinou a importância de buscar o saber científico e o saber da alma. E por ser meu mestre a cada segundo da minha vida me ensinando a viver com dignidade, honestidade, inteligência, força e ser meu exemplo de perseverança em todos os momentos.

A minha mãe Lucilene por me fazer enxergar a vida com tanta alegria, amor, carinho e ternura.

Ao meu irmão Felipe por seu companheirismo, afeto e também exemplo de força na minha vida.

Ao Enrico Seyssel Ortolani, meu grande amor... Meu maior incentivador... Meu parceiro nessa caminhada e a minha descoberta mais valiosa.

AGRADECIMENTOS

ACKNOWLEDGEMENTS

A Deus, inesgotável fonte de paciência, sabedoria e amor... À espiritualidade pela oportunidade de recomeçar e evoluir e à Iemanjá por guiar meus passos. Odoyá.

Ao Prof. Dr. Fabio Gregori, meu orientador, o meu reconhecimento pela oportunidade de realizar este trabalho; meu respeito e admiração ao seu Dom no ensino da Ciência, inibindo sempre a vaidade em prol da simplicidade e eficiência.

To the researchers at the Virginia Tech Carilion Research Institute -McDonald Lab (Roanoke, Virginia) with whom I've had the great opportunity to learn and develop part of my PhD. Especially, I am hugely thankful to Dr. Sarah McDonald, my mentor in the USA, for numerous helpful advices and inspiring discussion, for her patience, motivation, enthusiasm, efficiency, immense knowledge, sense of humor, kindness and great humanity. Thank you all for the good moments we spent together and all the teachings (Crystal Boudreax, Allison McKell, Shu Zhang, John Patton) and all the medical students. I will never forget you all.

À minha segunda família, Família Seyssel Ortolani (Enrico Seyssel Ortolani, Eliane, Júlia, Vovô Waldemar e Vovó Cleyde, Sérgio e Verinha) pelo acolhimento, respeito, carinho e amor. E especialmente, ao Prof. Dr. Enrico Lippi Ortolani por toda a sabedoria e horas de conversas sempre agradáveis sobre ciência e sobre a vida. E que venham horas infinitas de convivência com todos vocês.

Aos grandes amigos e familiares que mesmo à distância estão sempre no meu coração e acreditam na minha capacidade, em especial à tia Maria Angélica (madrinha), minha prima querida Mariella, à Jamile Massahud, Clara Palagiano, Thaís Rocha, Helena Carvalho, Guilherme Band e Thabata Caruzo. Carrego comigo sempre o carinho de vocês.

Aos meus tios Josefina e Walter por sempre me apoiarem e à minha prima Simone (in memorian) por ter sido tão guerreira e com seu exemplo de luta ter me inspirado, mesmo através da dor, a viver em busca do conhecimento.

Aos amigos do VPS, Karine, Luís Luna, Laila, Gisele Ayres e Cíntia Fávero pela torcida e ajuda em vários aspectos. E à Paloma e Karen Ferrari pela ajuda na coleta de amostras.

Aos membros da Comissão Examinadora na banca de qualificação: Profa. Dra Adriana Luchs e Prof. Dr. Paulo Eduardo Brandão pelas valiosas contribuições.

A todos os docentes, funcionários, pós-graduandos e alunos do VPS da FMVZ-USP, em especial Sandra Sanches, Alexandre Sanches, Sheila Oliveira de Souza Silva, Pedro César Ferreira da Silva, Renato Caravieri, Antônio dos Santos Rodrigues, Cristina Paick, Virgínia e Danival Lopes Moreira pela enorme disponibilidade em ajudar, incentivo, conversas e amizade.

A todos os funcionários da Biblioteca Virgine Buff D' Ápice da FMVZ-USP, pela atenção e esclarecimentos bibliográficos.

Aos animais de todas as espécies e de todos os planetas os quais devo toda a minha dedicação e empenho, especialmente, a Pandorinha, Lolo e Matilde, que me ensinam a todo o momento a ser uma pessoa melhor.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro ao projeto (no do processo: 2011/00870-0). À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida (no do processo: 1079750).

Ao TEMPO, que apaga tudo que deve ser esquecido e eterniza o que realmente tem valor.

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

pela bolsa concedida

(nº do processo: 1079750).

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

pelo auxílio financeiro ao projeto

(nº do processo: 2011/00870-0).

Que cada um considere a si mesmo, não como um homem procurando satisfazer sua própria sede de conhecimento [...] mas como um colaborador numa grande obra comum relacionada com os interesses supremos da humanidade. ”

Hermann Von Helmholtz

(1821-1894)

RESUMO

FERNANDA, F. D. F. **Análise multigênica de rotavírus do grupo A em suínos.** [Multigenic analysis of porcine group A rotavirus]. 2016. 127 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Os rotavírus do grupo A (RVA) são importantes causadores de diarreias virais em crianças e animais jovens de diferentes espécies, com impactos na saúde pública e animal. Visando contribuir para o entendimento e prevenção das rotaviroses assim como suas possíveis relações zoonóticas, caracterizou-se os 11 segmentos de dsRNA de rotavírus codificadores das proteínas estruturais e não estruturais presentes em amostras fecais positivas de suínos coletadas nos anos de 2012-2013, em 2 estados brasileiros. Mediante o emprego de RT-PCR, sequenciamento nucleotídico e análises filogenéticas, todos os segmentos genéticos oriundos de 12 amostras de RVA detectados em suínos foram analisados e comparados com os de outras amostras descritas previamente. As sequências obtidas para os genes codificadores das proteínas NSP2, NSP3 e VP6 contemplaram a *open reading frame* (ORF) completa do gene, enquanto que a ORF parcial foi determinada para os genes codificadores das proteínas VP1, VP2, VP3, VP4, VP7, NSP1, NSP4, NSP5 e NSP6. Os genotipos de rotavírus suíno provenientes das regiões amostradas concordam com os mais frequentemente descritos nesta espécie animal, apresentando, assim, uma matriz genética suína com a maioria dos segmentos pertencentes à constelação genotípica 1, com exceção dos genes codificadores das proteínas VP6 e NSP1, os quais foram os genotipos I5 e A8, respectivamente. Apesar de predominar o genotipo 1 (*Wa-like*) nas sequências deste estudo, a análise genômica sugere a existência de uma variação intragenotípica no genoma do rotavírus do grupo A atualmente circulante nas populações suína amostradas dos estados de São Paulo e Mato Grosso. Adicionalmente, buscou-se identificar os aminoácidos relacionados com a adaptação dos rotavírus no hospedeiro e assinaturas genéticas que distinguissem RVA suíno e humano. Para isso, as sequências obtidas neste estudo foram comparadas com outras cepas de RVA detectadas nestas duas espécies e pertencentes ao genotipo 1 (*Wa-like*) disponíveis no *Genbank*. Como resultados foram encontrados mais de 75 sítios de mudanças de aminoácidos que diferenciam RVA suíno e humano além de sítios de substituição

presentes em algumas proteínas virais que frequentemente covariaram entre elas. Estes resultados proporcionam um maior entendimento da diversidade viral circulante em unidades de produção suína e uma melhor compreensão dos animais como reservatórios genéticos de cepas de rotavírus emergentes em humanos.

Palavras-chave: Grupo A de rotavírus. Sequenciamento genômico completo. Suínos. Constelações.

ABSTRACT

FERNANDA, F. D. F. **Multigenic analysis of porcine group A rotavirus**. [Análise multigênica de rotavírus do grupo A em suínos]. 2016. 127 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Group A rotaviruses (RVA) are leading causes of viral diarrhea in children and in the young of many animals species with impacts on public and animal health. To contribute to the understanding and prevention of rotaviruses as well as its possible zoonotic relationships, it was characterized the 11 segments of dsRNA rotavirus encoding the structural and nonstructural proteins present in positive fecal samples from pigs collected in the years 2012-2013 in 2 Brazilian states. Using RT-PCR, nucleotide sequencing, and phylogenetic analyses, all gene segments from 12 RVA samples detected in pigs were analyzed and compared with the other samples as described previously. The sequences obtained for the NSP2, NSP3, and VP6 coding genes covered the complete open reading frame (ORF), while the partial ORF was determined for the VP1, VP2, VP3, VP4, VP7, NSP1, NSP4, NSP5 and NSP6 coding genes. The genotypes of porcine rotavirus from the sampled regions agree with the most frequently reported in this species, presenting thus a porcine-RVA-like backbone with most segments being designated as constellation genotype 1, with the exception of the VP6 and NSP1 coding genes, which were genotypes I5 and A8, respectively. Although genotype 1 (Wa-like) sequences were predominant in this study, the genomic analysis suggests the existence of a intragenotypic variation in group A rotavirus genome currently circulating in swine populations sampled in the states of São Paulo and Mato Grosso. In addition, we sought to identify the amino acids related to the adaptation of rotavirus in the host and genetic signatures that distinguish RVA pig and human. For this, the sequences obtained in this study were compared with other strains of RVA detected in these two species, belonging to genotype 1 (Wa-like) available in Genbank. The following results were found more than 75 sites of amino acid changes that differentiate RVA pig and human as well as substitution sites present in some viral proteins that often covaried between them. These results provide a greater understanding of the current viral diversity in swine production units and a better understanding of animals as genetic reservoirs emerging rotavirus strains in humans.

Keywords: Group A rotaviruses. Complete genome sequencing. Swine.
Constellation.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Aspecto dos vírions de rotavírus, apresentando aproximadamente 80 nm de diâmetro.....28
- Figura 2 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) do genoma de rotavírus codificando proteínas estruturais e não estruturais.....29
- Figura 3 - Representação esquemática da estrutura dos segmentos genômicos dos dsRNA de rotavírus30
- Figura 4 - Ciclo de replicação do rotavírus42
- Figura 5 - Fluxograma dos procedimentos aplicados nas amostras de fezes de suínos e as sequências genéticas obtidas47
- Figura 6 - Árvores filogenéticas construídas com o critério de *maximum likelihood* para os genes VP6-VP1-VP2 (A), VP3-NSP1-NSP2 (B) e NSP3-NSP4-NSP5 (C), exceto para os genes VP4 e VP7. Utilizou-se ~ 1800 sequências de RVA suíno e humano com mais de 500 pb cada uma. O grupo DS-1 foi utilizado como *outgroup*. Os valores de *bootstrap* são mostrados em porcentagens. Os principais agrupamentos são representados por triângulos colorido em verde (amostras de origem humana), azul escuro (amostras de origem suína) azul claro (amostras consideradas atípicas de origem suína ou humana).67
- Figura 7 - Representações esquemáticas lineares das proteínas codificantes VP6-VP1-VP2-VP3 (A) e NSP1-NSP2-NSP3 (B) e os resíduos que distinguem RVA suíno e humano. Em vermelho são indicados os sítios que diferenciaram absolutamente entre os RVA destas duas espécies. Em amarelo são indicadas as posições que covariaram intermolecularmente com pelo menos uma proteína.69
- Figura 8 - Conexões por pares de proteínas. Matriz mostrando o número de conexões intermoleculares de cada par de proteínas com ponto de corte ≥ 3071
- Figura 9 - Árvore filogenética construída com o critério de *maximum likelihood* baseado na sequência parcial da ORF do gene codificante VP7. Legenda: As amostras suínas analisadas neste estudo estão marcadas com um triângulo. A escala representa o número de substituições/sítio. Os valores de *bootstrap* (100 repetições) acima de 70% são mostrados

nos nós correspondentes. A cepa RVA/Pigeon-tc/JPN/PO-13/1983/G18P[17] foi usada como *outgroup*.....72

Figura 10 - Árvore filogenética construída com o critério de *maximum likelihood* baseado na sequência parcial da ORF do gene codificante VP4. Legenda: As amostras suínas analisadas neste estudo estão marcadas com um triângulo. A escala representa o número de substituições/sítio. Os valores de bootstrap (100 repetições) acima de 70% são mostrados nos nós correspondentes. A cepa RVA/Pigeon-tc/JPN/PO-13/1983/G18P[17] foi usada como *outgroup*.....73

Figura 11 - Árvore filogenética construída com o critério de *maximum likelihood* baseado na sequência completa da ORF do gene codificante VP6. Legenda: As amostras suínas analisadas neste estudo estão marcadas com um triângulo. A escala representa o número de substituições/sítio. Os valores de *bootstrap* (100 repetições) acima de 70% são mostrados nos nós correspondentes. A cepa RVA/Pigeon-tc/JPN/PO-13/1983/G18P[17] foi usada como *outgroup*.....74

Figura 12 - Árvore filogenética construída com o critério de *maximum likelihood* baseado na sequência parcial da ORF do gene codificante VP1. Legenda: As amostras suínas analisadas neste estudo estão marcadas com um triângulo. A escala representa o número de substituições/sítio. Os valores de *bootstrap* (100 repetições) acima de 70% são mostrados nos nós correspondentes. A cepa RVA/Pigeon-tc/JPN/PO-13/1983/G18P[17] foi usada como *outgroup*.....75

Figura 13 - Árvore filogenética construída com o critério de *maximum likelihood* baseado na sequência parcial da ORF do gene codificante VP2. Legenda: As amostras suínas analisadas neste estudo estão marcadas com um triângulo. A escala representa o número de substituições/sítio. Os valores de *bootstrap* (100 repetições) acima de 70% são mostrados nos nós correspondentes. A cepa RVA/Pigeon-tc/JPN/PO-13/1983/G18P[17] foi usada como *outgroup*.....76

Figura 14 - Árvore filogenética construída com o critério de *maximum likelihood* baseado na sequência parcial da ORF do gene codificante VP3. Legenda: As amostras suínas analisadas neste estudo estão marcadas com um triângulo. A escala representa o número de substituições/sítio. Os valores de *bootstrap* (100 repetições) acima de 70% são mostrados nos nós correspondentes. A cepa RVA/Pigeon-tc/JPN/PO-13/1983/G18P[17] foi usada como *outgroup*.....77

- Figura 15 - Árvore filogenética construída com o critério de *maximum likelihood* baseado na sequência parcial da ORF do gene codificante NSP1. Legenda: As amostras suínas analisadas neste estudo estão marcadas com um triângulo. A escala representa o número de substituições/sítio. Os valores de *bootstrap* (100 repetições) acima de 70% são mostrados nos nós correspondentes. A cepa RVA/Pigeon-tc/JPN/PO-13/1983/G18P[17] foi usada como *outgroup*.....78
- Figura 16 - Árvore filogenética construída com o critério de *maximum likelihood* baseado na sequência completa da ORF do gene codificante NSP2. Legenda: As amostras suínas analisadas neste estudo estão marcadas com um triângulo. A escala representa o número de substituições/sítio. Os valores de *bootstrap* (100 repetições) acima de 70% são mostrados nos nós correspondentes. A cepa RVA/Pigeon-tc/JPN/PO-13/1983/G18P[17] foi usada como *outgroup*.....79
- Figura 17 - Árvore filogenética construída com o critério de *maximum likelihood* baseado na sequência completa da ORF do gene codificante NSP3. Legenda: As amostras suínas analisadas neste estudo estão marcadas com um triângulo. A escala representa o número de substituições/sítio. Os valores de *bootstrap* (100 repetições) acima de 70% são mostrados nos nós correspondentes. A cepa RVA/Pigeon-tc/JPN/PO-13/1983/G18P[17] foi usada como *outgroup*.....80
- Figura 18 - Árvore filogenética construída com o critério de *maximum likelihood* baseado na sequência parcial da ORF do gene codificante NSP4. Legenda: As amostras suínas analisadas neste estudo estão marcadas com um triângulo. A escala representa o número de substituições/sítio. Os valores de *bootstrap* (100 repetições) acima de 70% são mostrados nos nós correspondentes. A cepa RVA/Pigeon-tc/JPN/PO-13/1983/G18P[17] foi usada como *outgroup*.....81
- Figura 19 - Árvore filogenética construída com o critério de *maximum likelihood* baseado na sequência parcial da ORF do gene codificante NSP5. Legenda: As amostras suínas analisadas neste estudo estão marcadas com um triângulo. A escala representa o número de substituições/sítio. Os valores de *bootstrap* (100 repetições) acima de 70% são mostrados nos nós correspondentes. A cepa RVA/Pigeon-tc/JPN/PO-13/1983/G18P[17] foi usada como *outgroup*.....82

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Definição dos genótipos de rotavírus baseado nos valores de corte de porcentagens de similaridade de nucleotídeos estipulados para os 11 segmentos genômicos	33
Quadro 2 - Principais características dos segmentos dsRNA e proteínas de rotavírus símio A/SA11	38
Quadro 3 - Relação dos <i>primers</i> , respectivas sequências, posição no gene e referências utilizadas na caracterização dos 11 genes de rotavírus no presente estudo	51
Quadro 4 - Condições de termociclagem para a amplificação dos 11 genes dos rotavírus.....	52
Quadro 5 - Relação dos municípios de origem das amostras selecionadas para o sequenciamento dos 11 genes dos rotavírus	56
Quadro 6 - Constelações genotípicas e relações genéticas de RVA em suínos detectados neste estudo e amostras de RVA em humanos	58

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Adenina
cDNA	ácido desoxirribonucleico complementar
C	citossina
Cl ⁻	Cloro
DEPC	dietilpirocarbonato
dNTP	desoxinucleotídeos trifosfatos
dsRNA	fitas duplas de ácido ribonucleico
DTT	dithiothreitol
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
EGPA	eletroforese em gel de poliacrilamida
eIF4G	fator de iniciação de tradução de eucariotos – 4 gama
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
et al.	e colaboradores
g	gravidade terrestre (9,8 m/s ²)
G	guanina
K	Keto (G/T)
kDA	kilodalton
LABMAS	Laboratório de Biologia Molecular Aplicada e Sorologia
M	molar
MEGA	<i>Molecular Evolutionary Genetics Analysis</i>
Mg ²⁺	magnésio
mM	milimolar
M-MLV	<i>Moloney Murine Leukemia Virus</i>
mRNA	RNA mensageiro
Na ⁺	Sódio
NaCl	cloreto de sódio
ng	nanogramas
nm	nanômetros
NSP	<i>Non-Structural Protein</i>
nt	nucleotídeos
ORF	<i>open reading frame</i>

p/v	partes por volume
PABP	<i>poly-A- binding protein</i>
pb	pares de base
PCR	reação em cadeia da polimerase
pH	potencial hidrogeniônico
pmol	picomol
q.s.p.	quantidade suficiente para
R	purina (A ou G)
RNA	ácido ribonucleico
RT	transcrição reversa
RT-PCR	transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase
RVA	rotavírus do grupo A
ssRNA	fitas simples de ácido ribonucléico
T	timina
U	unidades
v/v	volume por volume
VP	<i>Viral Protein</i>
VTCRI	<i>Virginia Tech Carilion Research Institute</i>
W	<i>weak</i> (A/T)
Y	pirimidina (C/T)
μL	microlitros

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
°C	graus Celsius
®	marca registrada
™	trademark

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
2	REVISÃO DE LITERATURA	27
2.1	ASPECTOS HISTÓRICOS DOS ROTAVÍRUS.....	27
2.2	ESTRUTURA DO VÍRION E CLASSIFICAÇÃO.....	28
2.3	DIVERSIDADE GENOTÍPICA E EVOLUÇÃO VIRAL.....	31
2.4	PROTEÍNAS VIRAIS ESTRUTURAIS.....	35
2.5	PROTEÍNAS VIRAIS NÃO ESTRUTURAIS.....	38
2.6	REPLICAÇÃO VIRAL.....	41
2.7	TRANSMISSÃO E PATOGÊNESE DOS ROTAVÍRUS.....	43
2.8	DIAGNÓSTICO.....	44
3	OBJETIVOS	46
4	MATERIAL E MÉTODOS	47
4.1	FLUXOGRAMA DE TRABALHO.....	47
4.2	AMOSTRAGEM E PREPARO DAS SUSPENSÕES FECALIS.....	48
4.3	EXTRAÇÃO DE dsRNA DE ROTAVÍRUS SUÍNO.....	48
4.4	REAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO REVERSA (RT) E PCR.....	49
4.5	REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO NUCLEOTÍDICO.....	52
4.6	ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS.....	53
4.7	ANÁLISE FILOGENÉTICA.....	53
4.8	ANÁLISES DE BIOINFORMÁTICA REALIZADAS NO VTCRI.....	54
4.8.1	Alinhamento das sequências nucleotídicas e filogenias	54
4.8.2	Identificação dos sítios de aminoácidos e covariação	55
5.	RESULTADOS	56
5.1	REAÇÕES DE RT-PCR E SEQUENCIAMENTO NUCLEOTÍDICO.....	56
5.2	CONSTELAÇÕES GENOTÍPICAS.....	57
5.3	ANÁLISES DOS GENES CODIFICANTES.....	59
5.3.1	Análise dos genes codificantes VP7 e VP4	59
5.3.2	Análise dos genes codificantes VP6, VP1, VP2 e VP3	61
5.3.3	Análise dos genes codificantes NSP1, NSP2 e NSP3	63
5.3.4	Análise dos genes codificantes NSP4 e NSP5	64
5.4	FILOGENIAS, ASSINATURAS GENÉTICAS E COVARIAÇÃO.....	65

6	DISCUSSÃO.....	83
7	CONCLUSÃO.....	91
	REFERÊNCIAS.....	92
	APÊNDICES.....	111

1 INTRODUÇÃO

A carne suína é a fonte de proteína animal mais consumida no mundo. Nos últimos 15 anos, o Brasil aumentou em 600% as exportações e em 40% a produção de carne suína (USDA, 2015), classificando o país como o quarto maior produtor e exportador mundial deste produto e deve se manter nessa posição até 2018, com produção média anual de 2,84% e exportação de 4,91% (ABPA, 2015; USDA, 2015).

A demanda pelo consumo da proteína animal tem resultado na intensificação da criação de suíno o que leva à emergência de doenças infecciosas que desafiam a suinocultura mundial. Neste contexto, é imprescindível o controle de enfermidades nos rebanhos, sendo que as infecções entéricas estão entre as mais frequentes na produção em todo o mundo ocasionando consideráveis prejuízos econômicos (FOURNIE et al., 2012).

A gastroenterite em suínos é considerada uma doença multifatorial e multietiológica, já que diferenças na prática do manejo aliado a possibilidades de coinfeções por microrganismos como bactérias (*Escherichia coli* enterotoxigênica e *Clostridium perfringes* tipo C), protozoários (*Cryptosporidium spp* e *Isospora suis*) e vírus (rotavírus, coronavírus e calicivírus), (BARRY; ALFIERI; ALFIERI, 2008; ZLOTOWSKY et al., 2008; JEONG et al., 2009; LINARES et al., 2009; MÉDICI et al., 2011; MARTHALER et al., 2012) agravam o quadro, representando contínuos desafios para a indústria de carne suína aumentando os custos com tratamento e prevenção (PAHO, 2001; KATSUDA et al., 2006).

Dentre os agentes virais, os rotavírus do grupo A (RVA) são importantes causadores de graves diarreias neonatais em humanos e animais de diferentes espécies. Em suínos, é a principal causa de diarreia viral aguda em leitões lactentes e pós-desmame com impacto econômico na produção em termos de mortalidade e morbidade (CHANG; KIM; SAIF, 2012). No país, os RVA tem sido alvo de estudos em diversas regiões (GATTI et al., 1989; SANTOS et al., 1999; RÁCZ et al., 2000; GREGORI et al., 2009; LINARES et al., 2009; LORENZETTI et al., 2011, 2014; MÉDICI et al., 2011; CAMARGO et al., 2012; BARBOSA et al., 2013; TONIETTI et al., 2013b; SILVA et al., 2015), caracterizando a prevalência do agente nos rebanhos suínos brasileiros.

Além do comprometimento da produtividade, os rotavírus constituem potencial fonte de infecções heterólogas para humanos e animais (MARTELLA et al., 2010). Diversos estudos descrevem que o rotavírus suíno possui segmentos genômicos geneticamente similares àqueles vírus isolados em humanos, cavalos e vacas (MATTHIJNSSENS et al., 2008a; HA et al., 2009; GHOSH et al., 2012a; HWANG et al., 2012).

Assim, o presente estudo, além de descrever os genótipos de rotavírus encontrados nas regiões amostradas, informação esta necessária para medidas profiláticas e ações de vigilância mais efetivas, também propõe uma análise filogenética que engloba todos os segmentos genômicos deste vírus encontrados nos rebanhos suínos. Esta abordagem traz informações que permite o estudo acerca dos processos evolutivos dos rotavírus nesta espécie, assim como a análise dos perfis de covariação e caracterização de assinaturas genéticas fornecendo elementos para melhor entendimento da patogenia, epidemiologia molecular e aspecto zoonótico deste agente viral.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ASPECTOS HISTÓRICOS DOS ROTAVÍRUS

O primeiro relato sugerindo a participação de agentes virais em doenças entéricas foi realizado por Light e Hodes (1943), após induzirem diarreia em bezerros jovens inoculados experimentalmente com um filtrado de fezes de crianças, durante surtos de diarreia ocorridos em berçários de Baltimore e Washington, nos Estados Unidos.

Em animais, a primeira descrição da presença do rotavírus foi feita por Mebus et al. (1969), que demonstraram por intermédio da microscopia eletrônica a presença de partículas virais de morfologia esférica em amostras de fezes de bezerros com diarreia, as quais foram inicialmente denominadas NCDV (*Nebraska Calf Diarrhea Virus*). Especificamente em suínos, os rotavírus foram detectados pela primeira vez por Rodger et al. (1975).

Em humanos, os rotavírus foram inicialmente descritos por Bishop et al. (1973), na Austrália, ao se realizar estudos de biópsia da mucosa duodenal de crianças com diarreia por meio da microscopia eletrônica. No mesmo ano, na Inglaterra, Flewett, Bryden e Davies (1973) também encontraram partículas virais nas fezes de crianças com diarreia aguda através da microscopia eletrônica. No ano seguinte, Flewett, Bryden e Davies (1974) propuseram a denominação Rotavírus, anteriormente nominada *Reovirus-like*, pois as partículas virais apresentavam morfologias semelhantes a uma roda (latim: *rota*), quando observadas ao microscópio eletrônico (Figura 1). O gênero *Rotavírus*, viria a ser definido oficialmente em 1978 pelo *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) durante o 4º Congresso Internacional de Virologia (MATTHEWS, 1979).

Figura 1 – Aspecto dos vírions de rotavírus, apresentando aproximadamente 80 nm de diâmetro

Fonte: CDC/DR. Erskine Palmer

No Brasil, os RVA foram descritos pela primeira vez durante as investigações de quadros de diarreia em crianças no Pará (LINHARES et al., 1977). Desde então, inúmeros outros estudos deram início no país e em nível internacional, abrangendo aspectos desde os primeiros achados por microscopia eletrônica até a caracterização molecular das cepas circulantes em humanos e animais, atestando a importância e a relevância dos rotavírus na etiologia das diarreias em diversas espécies de mamíferos e de aves (ASANO et al., 2010; DHIMAN et al., 2015; MARCONI et al., 2015).

2.2 ESTRUTURA DO VÍRION E CLASSIFICAÇÃO

Os rotavírus pertencem à família *Reoviridae*, gênero *Rotavirus*, e são caracterizados por partículas esféricas de simetria icosaédrica, não envelopadas, com 80nm de diâmetro (ATTOUI et al., 2011). A partícula viral possui três camadas proteicas caracterizando um capsídeo triplo, designados como *core* viral (camada interna do capsídeo) constituída por três proteínas: VP1, a polimerase viral; VP3, com atividade de guanilil transferase; e mais externamente, a VP2, responsável pela ligação do RNA ao interior do *core* e necessária para a atividade de replicase da

VP1; capsídeo intermediário (camada que circunda o *core*) constituído pela proteína VP6, que possui propriedades imunogênicas; capsídeo externo (camada que circunda o capsídeo interno) constituído pelas proteínas estruturais VP4, que corresponde às espículas da partícula viral e a glicoproteína VP7 (ESTES; GREENBERG, 2013) (Figura 2).

O genoma dos rotavírus é constituído por 11 segmentos de RNA fita dupla (dsRNA), com tamanhos que variam de 663 a 3302 pares de base (pb). Cada segmento do dsRNA codifica pelo menos uma proteína, sendo seis estruturais, VP (*Viral Protein*) - VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 e VP7 - e seis proteínas não estruturais, NSP (*Non-Structural Protein*), denominadas NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 e NSP6. Os segmentos genômicos são monocistrônicos, exceto o segmento 11 (bicistrônico) que possui uma segunda ORF, expressando tanto a proteína NSP5, como a NSP6 (ESTES; GREENBERG, 2013) (Figura 2).

Figura 2 – Eletroforese em gel de poliácridamida (EGPA) do genoma de rotavírus codificando proteínas estruturais e não estruturais

Fonte: Adaptado de Estes (2001).

Legenda: RNA dupla fita segmentado (A); proteínas codificadas por cada segmento genômico (B); partícula de rotavírus representada esquematicamente (C); partícula de rotavírus e sua estrutura determinada por eletromicroscopia associada ao processamento de imagem por computador (D).

O genoma viral tem em média 18.550 pb, sendo que cada segmento de dsRNA apresenta uma guanina na extremidade 5' seguida por uma sequência conservada de nucleotídeos, que é a região não codificadora (RNC). Estas sequências terminais dos segmentos dos rotavírus, RNC, por serem altamente conservadas, contêm informações importantes para a replicação viral, como sinais para transcrição, transporte do RNA e para a montagem ou empacotamento dos segmentos genômicos (PATTON; SPENCER, 2000). A ORF corresponde à região codificadora das proteínas (ESTES, 2001) e está representada esquematicamente na Figura 3.

Figura 3 – Representação esquemática da estrutura dos segmentos genômicos dos dsRNA de rotavírus

Fonte: Adaptado de Estes (2001).

Legenda: AUG- Códon de iniciação para a síntese proteica

Os rotavírus apresentam especificidades antigênicas de grupo, subgrupo e sorotipo, permitindo a classificação de múltiplos grupos (ou sorogrupos) e a existência de múltiplos sorotipos dentro de cada grupo (ESTES; GREENBERG, 2013). Assim, baseado nas propriedades antigênicas e sequências nucleotídicas da proteína viral do capsídeo interno (VP6), os rotavírus são divididos em 7 sorogrupos altamente diversos geneticamente e denominados de A a H (ATTOUI et al., 2011).

Embora humanos e animais sejam infectados por rotavírus do grupo A, B, C e H, o grupo A de rotavírus é considerado o mais importante devido a sua alta

prevalência e patogenicidade (ESTES; GREENBERG, 2013), inclusive em suínos, enquanto que os grupos D, E, F e G têm sido descritos apenas em animais (MATTHIJNSSENS; MARTELLA; VAN RANST, 2010; MATTHIJNSSENS et al., 2012).

2.3 DIVERSIDADE GENOTÍPICA E EVOLUÇÃO VIRAL

As proteínas VP4 e VP7, por induzirem anticorpos neutralizantes, servem de critério de escolha das amostras vacinais e seus respectivos genes codificantes são marcadores para a caracterização das amostras em genotipos P (protease-sensível) e G (glicoproteína) de rotavírus (ESTES; GREENBERG, 2013). Assim, de acordo com essas diferenças moleculares, dentro do grupo A dos rotavírus foram descritos até o momento, 27 tipos G e 37 tipos P, e no mínimo 73 combinações de genotipos G/P acometendo diferentes espécies hospedeiras (MATTHIJNSSENS et al., 2011; TROJNAR et al., 2013) (Quadro 1). Destes, 12 genotipos G (G1-G6, G8-G12 e G26) e 13 genotipos P (P[1], P[5]-P[8], P[11], P[13], P[19], P[23], P[26], P[27], P[32] e P[34]) foram associados com suínos (STEYER et al., 2008; COLLINS et al., 2010; MATTHIJNSSENS et al., 2011). No entanto, G3, G4, G5 e G11 são os tipos G mais comuns identificados nesta espécie e geralmente estão associados com P[6], P[7], P[13], P[19] e P[23]; os outros são considerados genotipos menos comuns (WANG et al., 2010; PAPP et al., 2013). A emergência de rotavírus distintos geneticamente está ligada a capacidade de causar diarreia em suínos lactentes (BARREIROS et al., 2003; LORENZETTI et al., 2011; MIYAZAKI et al., 2011).

Embora determinados tipos G e P estejam geralmente restritos a espécies animais específicas, implicando preferência de hospedeiros, um grande número de genotipos e combinações diferentes foram detectados em múltiplas espécies, incluindo humanos, sugerindo a transmissão interespecies (MATTHIJNSSENS et al., 2008b). Vários estudos caracterizaram uma origem suína em segmentos de RVA de genotipos G3, G4, G5, G9, P[6] e P[7] detectados em humanos, equinos e bovinos (HA et al., 2009; MARTELLA et al., 2010; GHOSH et al., 2012a; HWANG et al., 2012). Além disso, segmentos genômicos de RVA de suínos foram denominados *human-like* ou *bovine-like*, reforçando a ocorrência de eventos recombinantes entre

estes vírus originados de diferentes espécies animais (GHOSH et al., 2006; MARTELLA et al., 2006). De uma maneira geral, estes estudos reforçam a ideia de que os suínos representam um *pool* genético significativo para rotavírus humanos e outros animais (LACHAPELLE et al., 2014).

A compreensão de como o vírus evolui durante a sua propagação na natureza é fundamental na prevenção de doenças causadas por cepas emergentes. No processo de evolução viral, é necessário que ocorra diversidade genética na população existente para que a pressão de seleção promova o surgimento de variantes com maior aptidão (SMITH et al., 2009). Os rotavírus são capazes de aumentar a sua variabilidade genética através de mecanismos que contribuem para a adaptação viral ao hospedeiro (MATTHIJNSSENS; DESSELBERGER, 2012). Dentre eles, o *reassortment* ou *genetic shift* ocorre quando uma mesma célula é infectada por mais de uma partícula viral e a progênie passa a conter genes e propriedades fenotípicas desses vírus parentais (ESTES 2001). Assim, a natureza segmentada do genoma dos rotavírus permite a troca de um ou mais segmentos durante simultâneas infecções com múltiplas amostras de RVA de origem humana e animal (MONINI et al., 2014). De acordo com McDonald et al. (2009), comparado ao mecanismo de evolução por mutação que ocorre mais lentamente, a uma taxa de 10^{-3} a 10^{-5} mudanças por sítio de cópia, os eventos de *reassortment* podem ter consequências fenotípicas imediatas ao criar progênies quiméricas com genes derivados a partir de múltiplas estirpes parentais. Cada mudança fenotípica pode conferir vantagens seletivas aos vírus, por exemplo, aumentando sua capacidade de replicação dentro do hospedeiro ou permitindo infectar um novo hospedeiro. O *genetic drift* corresponde ao acúmulo de mutações pontuais no genoma em decorrência de erros causados pela maquinaria e replicação utilizada pelo vírus. As modificações conformacionais das proteínas, decorrentes de alterações genotípicas causadas por esse mecanismo podem resultar no aumento da antigenicidade das mesmas (PHAN et al., 2007; MATTHIJNSSENS; DESSELBERGER, 2012). Os rotavírus ainda apresentam a capacidade de realizar rearranjos genômicos (*rearrangements*) representados por alterações na sequência do segmento, algumas vezes na forma de deleção ou mais frequentemente como duplicação. Por sua vez, a recombinação genética tem sido descrita como um importante mecanismo de geração de variabilidade e evolução dos vírus, ainda que sejam poucos os relatos

registrando o acontecimento de eventos de recombinação intragênica em RVA (PARRA et al., 2004; WOROBEY; HOLMES, 1999).

Considerando a natureza segmentada do genoma e toda a diversidade genética, um novo sistema de classificação para os rotavírus, baseado no sequenciamento de nucleotídeos dos 11 segmentos de RNA que constituem o genoma viral, foi proposto recentemente por Matthijnssens et al. (2008b, 2011). A partir de valores de corte para porcentagens de similaridade de nucleotídeos (MATTHIJNSSENS et al., 2008a), definiram-se genótipos diferentes para cada segmento de RNA do vírus. Segundo este novo sistema de classificação, a notação de Gx-P[x]-Ix-Rx-Cx-Mx-Ax-Nx-Tx-Ex-Hx são utilizadas para os genes codificadores VP7-VP4-VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5/6, respectivamente. Assim, até o momento, além dos tipos G e P citados anteriormente, foram caracterizados 17I, 9R, 9C, 8M, 18A, 10N, 12T, 16E e 11H genótipos (genes VP6, VP1, VP2, VP3, NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, e NSP5, respectivamente) (BADARACCO et al., 2013; GUO et al., 2012; JERE et al., 2014; MATTHIJNSSENS et al., 2011; TROJNAR et al., 2013), em humanos e animais (Quadro 1).

Quadro 1 – Definição dos genótipos de rotavírus baseado nos valores de corte de porcentagens de similaridade de nucleotídeos estipulados para os 11 segmentos genômicos

Produto genômico	Valores de corte para porcentagem de similaridade de nt (%)	Genótipos n(x)	Origem da designação dos genótipos
VP7	80	G (27)	<i>Glycosilated</i>
VP4	80	P (37)	<i>Protease-Sensitive</i>
VP6	85	I (17)	<i>Inner Capsid</i>
VP1	83	R (9)	<i>RNA-dependent RNA Polymerase</i>
VP2	84	C (9)	<i>Core protein</i>
VP3	81	M (8)	<i>Methyltransferase</i>
NSP1	79	A (18)	<i>Interferon Antagonist</i>
NSP2	85	N (10)	<i>NTPase</i>
NSP3	85	T (12)	<i>Translation enhancer</i>
NSP4	85	E (16)	<i>Enterotoxin</i>
NSP5	91	H (11)	<i>pHosphoprotein</i>

Fonte: Adaptado de Matthijnssens et al. (2008b)

Nota: n(x): número de genótipos identificados até o momento

Através do estudo do genoma completo dos rotavírus observaram-se pelo menos três constelações genótípicas dominantes, as quais incluem a maioria das amostras detectadas em humanos e animais: I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1 (Constelação 1 - *Wa-like*) e I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-D2 (Constelação 2 - *DS-like*) (HEIMAN et al., 2008; MATTHIJNSSENS et al., 2008a; McDONALD et al., 2009). Supõe-se que as cepas de RVA detectadas em humanos (*Wa-like*) possuem um ancestral comum com RVA suíno, enquanto que as cepas de RVA (*DS-like*) possuem vários segmentos que caracterizam um ancestral comum com bovinos (MATTHIJNSSENS et al., 2008a). Uma terceira (menor) constelação genotípica refere-se à *AU-1-like* (I3, R3, C3, M3, A3, N3, T3, E3, H3) e acredita-se ser originada de cães e gatos (NAKAGOMI et al., 1989).

Estudos sobre a coevolução intramolecular entre sítios de aminoácidos dos genes tem sido um dos principais objetivos de geneticistas e bioinformatas que atuam nestas novas áreas de pesquisa. Muitos métodos foram desenvolvidos para compreender a dinâmica evolutiva dos organismos através da análise dos alinhamentos de múltiplas sequências (CODOÑER; FARES, 2008). Mas, muito pouco é conhecido sobre os mecanismos compensatórios e de mutações coadaptativas que fazem com que algumas proteínas virais atuem melhor quando permanecem juntas (DONLIN et al., 2012), especialmente dos rotavírus em suínos. Sabe-se que a covariação está presente quando a identidade de um resíduo em uma posição na sequência é no mínimo parcialmente dependente da identidade do resíduo na outra posição. A covariação tem sido amplamente utilizada para avaliar a estrutura do RNA (GOBEL et al., 1994; HONDA et al., 1999; HUANG, 2008; MARTINEZ-SALAS, 2008; WEILE et al., 2007) e menos extensivamente para analisar as interações intra-proteínas (LARSON; Di NARDO; DAVIDSON, 2000; OLMEA; ROST; VALENCIA, 1999).

A abordagem de coevolução baseia-se na ideia da covariação proposta por Fitch e Markowitz na década de 70 (FITCH; MARKOWITZ, 1970), em que em um momento particular ao longo da evolução, uma região da proteína é invariável (devido às limitações estruturais ou funcionais), enquanto outras acumulam mutações. No ano seguinte, surgiu o conceito de co-dependência entre os sítios de aminoácidos ou regiões proteicas (FITCH, 1971). Esta ideia é essencial para desvendar os mecanismos da evolução molecular e pode ter consequência para a previsão de estruturas virais e desenvolvimento de medicamentos (FARES, 2006).

De acordo com Fraser et al. (2004), a detecção de sítios de aminoácidos em coevolução tem sido considerada uma boa estratégia para: (i) anotações funcionais de proteínas codificadas por genes desconhecidos; (ii) revelar possíveis interações entre aminoácidos da mesma proteína; (iii) prever as interações proteína-proteína; (iv) compreender como alguns vírus sofrem alterações adaptativas sem ter efeitos significativos sobre o organismo.

Segundo Zhang et al. (2014), investigar a influência da coadaptação da proteína através da covariação de aminoácidos permite levantar questões sobre os mecanismos de diversidade genética e seu impacto na evolução dos rotavírus. Estudos comparativos do genoma deste agente em crianças, por exemplo, mostraram que a grande maioria das cepas humanas mantêm constelações de genes específicos e muito estáveis (HEIMAN et al., 2008), aumentando os questionamentos sobre possíveis restrições na evolução dos rotavírus.

2.4 PROTEÍNAS VIRAIS ESTRUTURAIS

No Brasil, existem poucos estudos sobre a caracterização molecular das proteínas estruturais do rotavírus do Grupo A em suínos, sendo descritos resultados para os segmentos genômicos VP4 e VP7 (SANTOS et al., 1999; RÁCZ et al., 2000; BARREIROS et al., 2003; GREGORI et al., 2009, 2012; LORENZETTI et al., 2011, 2014; MÉDICI et al., 2011; CAMARGO et al., 2012; TONIETTI et al., 2013b; SILVA et al., 2015).

A proteína VP1 (Quadro 2), codificada pelo segmento genômico 1 e localizada no *core* da partícula viral é considerada a maior proteína estrutural do vírus, de peso molecular 125kDa e constituída por 1089 aminoácidos. É uma RNA polimerase e além de sua função estrutural, apresenta atividade de replicase e transcriptase, catalizando a formação do dsRNA (LU et al., 2008). No entanto, para a atividade de replicação necessita da proteína VP2. Além disso, dentre as proteínas que constituem o *core* viral, apenas a VP1 tem uma sequência específica que reconhece o RNA viral através da região conservada de 4 bases, UGUG na extremidade 3' (HEIMAN et al., 2008; LU et al., 2008).

A proteína VP2, codificada pelo segmento genômico 2, é a proteína mais abundante do *core* viral e possui peso molecular de 102kDa, além de ser constituída por 882 aminoácidos. Tem uma função na estrutura e atividade do *core* viral, interagindo com a proteína VP6, transportando metabólitos e RNA mensageiro durante a transcrição e também atuando no complexo de replicação viral (HEIMAN et al., 2008; McDONALD; PATTON, 2011). A VP2 é considerada essencial para esta atividade de replicase junto com a proteína VP1 devido a sua habilidade de se ligar ao mRNA (RNA mensageiro). As proteínas VP1/VP3 estão ligadas a VP2 que por sua vez circunda o genoma do rotavírus (McCLAIN et al., 2010).

Embora a atividade da proteína VP3 (codificada pelo segmento genômico 3; peso molecular de 98kDa e 834 aminoácidos) na morfogênese viral não esteja completamente elucidada, vários estudos demonstram sua atividade de guanilil-metiltransferase, pois se liga covalentemente a guanosina trifosfato e provavelmente está envolvida na adição do *cap*, presente na extremidade 5' de todos os mRNAs virais (SUBODH; BHAN; RAY, 2006; HEIMAN et al., 2008). Além disso, sabe-se que a interação entre as proteínas VP1/VP2/VP3 é crítica para a replicação e transcrição do genoma viral (OGDEN et al., 2014).

A proteína VP4 é codificada pelo quarto segmento genômico, possui 776 aminoácidos constituindo 1,5% da proteína do vírion (ESTES, 2001) e ainda contém um sítio de clivagem pela tripsina que quando submetido ao tratamento com protease *in vitro* produz dois produtos, os peptídeos VP5* e VP8*, aumentando a infectividade do vírus (ESTES; GREENBERG, 2013). De uma forma geral, a proteína VP4 pode ser considerada multifuncional, já que está associada à indução de anticorpos neutralizantes; virulência e possui atividade hemaglutinante (RODRÍGUEZ et al., 2014). O peptídeo VP5*, apresenta peso molecular de 60kDa e contém 529 aminoácidos. Estudos demonstram que a subunidade VP5* induz a produção de anticorpos neutralizantes, conferindo imunidade protetora em seres humanos e animais. Além disso, está associado com a atividade de neutralização cruzada entre os diferentes tipos de VP4, e possui os epítomos responsáveis pela adsorção do vírus à célula com uma região variável e outra conservada (GREENBERG et al., 1983; ZÁRATE et al., 2000). O peptídeo VP8*, por sua vez, apresenta peso molecular de 28kDa e contém 247 aminoácidos e a maioria dos epítomos associados às reações tipo-específicas localizada numa região

hipervariável. A VP8* possui função na infectividade viral, imunidade e proteção contra a infecção (RUGGERI; GREENBERG, 1991; ZÁRATE et al., 2000).

A proteína VP6, codificada pelo sexto segmento genômico é o principal componente estrutural dos vírions, aproximadamente 51%, e interage com as proteínas VP4 e VP7 e também com a VP2 do core viral (MATHIEU et al., 2001; SETTEMBRE et al., 2011). A proteína forma a camada intermediária do vírus e possui peso molecular de 48kDa e contém 398 aminoácidos. É hidrofóbica e possui antígenos descritos como indutores de imunidade de proteção devido ao seu elevado potencial antigênico e imunogênico (ESTES; GREENBERG, 2013). Estas características, aliadas à presença de epítomos conservados entre diferentes amostras do vírus, sustentam ser tal proteína o antígeno de eleição para os ensaios diagnósticos (ESTES, 2001).

A VP7, codificada pelo segmento genômico nove é uma glicoproteína do capsídeo externo, sendo a segunda mais abundante, constituindo aproximadamente 30% do vírion. É responsável pela indução dos anticorpos neutralizantes, incluindo o sorotipo-específico. Apresenta peso molecular de 37kDa e uma ORF composta de 326 resíduos de aminoácidos; e domínios hidrofóbicos designados de H1 (aminoácidos 1 a 30) e H2 (aminoácidos 33 a 48), que podem funcionar como uma sequência “sinalizadora” que orienta a VP7 para o retículo endoplasmático (RE) (AOKI et al., 2009). Possui também domínios antigênicos variáveis responsáveis pela codificação dos epítomos neutralizantes. As sequências de aminoácidos entre as posições 87 a 101 (Domínio 7-1A) e 208 a 211 (Domínio 7-1B) são conservadas entre as cepas de mesmo sorotipo G, porém com variações entre cepas de diferentes sorotipos. Estas sequências são assinaturas que podem predizer o sorotipo de um novo isolado (McDONALD et al., 2009).

Quadro 2 – Principais características dos segmentos dsRNA e proteínas de rotavírus símio A/SA11

Segmento Genômico Tamanho (pb)	Proteína Viral	ORFs (pb)	Tamanho da proteína aa	Localização na partícula viral	Função das proteínas
1 (3302)	VP1	18-3282	1089	Core (capsídeo interno)	RNA polimerase dependente de RNA
2 (2690)	VP2	17-2659	882	Core (capsídeo interno)	Capacidade de ligação ao RNA; necessária à atividade de replicase da VP1
3 (2591)	VP3	50-2554	834	Core (capsídeo interno)	Guanililtransferase; ligação do dsRNA
4 (2362)	VP4	10-2337	776	Capsídeo externo	Proteína de superfície que forma espículas e se liga à célula; a clivagem por tripsina em VP5* e VP8* aumenta a infectividade da célula; antígeno de neutralização do tipo P.
	VP5*	247-776	529		
	VP8*	1-247	247		
5 (1611)	NSP1	31-1515	495	Não estrutural	Apresenta maior diversidade genética; possui região rica em cisteína (<i>zinc finger</i>) e se liga ao RNA.
6 (1356)	VP6	24-1214	398	Capsídeo interno	Principal proteína do vírion; Determina antígenos de grupo e subgrupo;
7 (1105)	NSP3	26-970	315	Não estrutural	Ligação à extremidade 3' dos mRNAs virais.
8 (1059)	NSP2	47-997	317	Não estrutural	Participa na formação dos viroplasmas. Ligação não específica ao dsRNA.
9 (1062)	VP7	49-1026	326	Capsídeo externo	Envolvido na entrada do vírus na célula. Antígeno de neutralização do tipo G
10 (751)	NSP4	41-569	175	Não estrutural	Atua como enterotoxina viral; associada ao retículo endoplasmático; papel essencial na morfogênese viral.
11 (667)	NSP5	22-615	198	Não estrutural	Interage com a VP2, NSP2 e NSP6.
	NSP6	80-355	92		Produto da segunda região ORF; presente no viroplasma e na maioria das amostras.

Fonte: Adaptado de Estes e Kapikian (2007)

2.5 PROTEÍNAS VIRAIS NÃO ESTRUTURAIS

As proteínas não estruturais (NSPs) (Quadro 2) dos rotavírus estão primariamente envolvidas na replicação viral e morfogênese de novas partículas virais (ESTES; GREENBERG, 2013). Além disso, são responsáveis por antagonizar a resposta antiviral do hospedeiro, subvertendo processos celulares e permitindo o sucesso da replicação do vírus, caracterizando a capacidade do rotavírus de evadir da resposta imune do hospedeiro (HU et al., 2012).

Embora os papéis funcionais das proteínas NSP2, NSP3, NSP4 e NSP5 durante a replicação dos rotavírus estejam bem definidos, a função da NSP1 e NSP6 permanece com pouca elucidação (HU et al., 2012). Apesar disso, recentes estudos

indicam que a NSP1 que é codificada pelo segmento 5, apresenta peso molecular de 58kDa, contém 495 aminoácidos e possui importantes variações nas sequências entre as cepas de rotavírus, não seja essencial para a replicação do vírus em culturas de células (ARNOLD; PATTON, 2011). A proteína é considerada um fator de virulência, antagonizando a resposta imune inata do hospedeiro ao mediar a degradação de fatores regulatórios de interferons (IRF3, IRF5 e IRF7) facilitando a transmissão do vírus célula a célula (MORELLI et al., 2015).

A proteína NSP2 é importante no processo de replicação/encapsidação do genoma, além de interagir com a NSP5 e outras proteínas estruturais na formação do viroplasma (CRIGLAR et al., 2014). Codificada pelo segmento genômico 8 (1059 pb), é composta por 317 aminoácidos e massa molecular de 35kDa (SCHUCK et al., 2001). De acordo com Hu et al. (2012), a NSP2 possui um domínio relacionado com a função de ligação com o RNA que é composto por 37 aminoácidos, cujos resíduos 6, 8, 85 e 285 estão envolvidos com as pontes dissulfídicas, o que garante a estrutura octamérica da proteína (JIANG et al., 2006). A NSP2 possui ainda uma extensa região conservada de 75 bases, incluindo 35 bases na região 5'- região não codificante - 3' e mais as primeiras 30 bases da ORF onde pode ocorrer mudanças conformacionais que são importantes para garantir à NSP2 a função de translocação do ssRNA (RNA fita simples) (HU et al., 2012). Ainda, através de estudos sobre as mutações em algumas regiões do gene que codifica para a proteína, demonstrou-se que a atividade NTPase da NSP2 está relacionada ao aminoácido histidina na posição 225, altamente conservado, que funciona como um resíduo catalítico para esta função enzimática. A mutação neste resíduo impede a síntese de dsRNA, não afetando a formação de viroplasmas (KUMAR et al., 2007).

A proteína NSP3, codificada pelo segmento 7, apresenta peso molecular de 36 kDa e contém 315 aminoácidos. Desempenha o papel de aumentar a eficiência da transcrição dos mRNA virais mediante o desligamento da síntese de proteínas celulares, tendo uma função análoga à PABP (proteína de ligação poli-A) e, ao ligar-se ao mRNA viral na sua extremidade consensual 3', circulariza-o através de interações com o eIF4G (fator de iniciação eucariótico) (GROFT; BURLEY, 2002; CHUNG; McCRAE, 2011).

A proteína NSP4, codificada pelo décimo segmento genômico, apresenta peso molecular de 20kDa e contém 175 aminoácidos. É uma glicoproteína transmembrana do retículo endoplasmático com funções na replicação viral e

patogênese. Age como um receptor intracelular para partículas com dupla camada recém-formadas e interage com proteínas do capsídeo viral durante a morfogênese do vírus (ZHANG et al., 2000). Também foi demonstrado que esta proteína apresenta atividade de enterotoxina capaz de induzir diarreia. A região foi descrita sendo pertencente entre os aminoácidos 114 a 135 e denominada de peptídeo toxigênico (BALL et al., 1996; KAVANAGH et al., 2010).

A NSP5, codificada pelo décimo primeiro segmento genômico, apresenta peso molecular de 22 kDa e contém 198 aminoácidos. É uma fosfoproteína dimérica rica em resíduos de serina e treonina (HU et al., 2012). A NSP5 ao se ligar ao dsRNA, também interage com a NSP2 e VP2 sofrendo alterações que incluem a O-glicosilação e hiperfosforilação (MARTIN et al., 2011). Dentre as várias propriedades que são atribuídas a NSP5 em estudos *in vivo* e *in vitro*, o único papel firmemente estabelecido, até o momento, para esta proteína é a ligação com a NSP2 para a formação dos viroplasmas e atuação na replicação do genoma do rotavírus (MARTIN et al., 2011; HU et al., 2012).

O segmento 11 também possui uma segunda ORF cuja função é codificar a proteína NSP6 que apresenta peso molecular de 12kDa e contém 92 aminoácidos. A proteína possui afinidade com o ssRNA e dsRNA além de se localizar no viroplasmas interagindo com a NSP5 nos processos de hiperfosforilação e dimerização (RAINSFORD; MCCRAE, 2007). Apesar de Holloway et al. (2015) sugerirem que a NSP6 pode ainda afetar funções na mitocôndria durante a infecção do rotavírus, o papel completo desta proteína na replicação dos rotavírus ainda precisa ser elucidado (HU et al., 2012).

Os genes NSP2 e NSP5/NSP6 foram estudados recentemente em amostras de RVA de alguns rebanhos do Estado de São Paulo (BARBOSA et al., 2013), assim como a detecção e posterior análise filogenética da proteína NSP5 de rotavírus encontrados simultaneamente em suínos e ratos (*Rattus norvergicus*) de um mesmo rebanho no Estado de São Paulo (TONIETTI et al., 2013a). A caracterização e análise molecular do gene codificador da NSP4 de RVA foi realizada em amostras de suínos provenientes de rebanhos do Estado de São Paulo (CUNHA, 2011).

2.6 REPLICAÇÃO VIRAL

Os rotavírus possuem tropismo celular por enterócitos maduros no topo da vilosidade intestinal do intestino delgado e a replicação ocorre exclusivamente no citoplasma das células (TRASK et al., 2012) (Figura 4). Estas são infectadas quando as partículas de rotavírus ultrapassam as barreiras de defesa do trato gastrointestinal. Para a adsorção dos rotavírus à célula hospedeira, inicialmente, ocorre a clivagem da proteína VP4 pela ação de enzimas proteolíticas (como a tripsina), resultando em dois peptídeos: VP8* e VP5*, facilitando a entrada do micro-organismo na célula. A penetração da partícula viral ocorre pelo sítio de ligação das proteínas VP4, VP8* e VP5* e depois, é auxiliada pela VP7. Há evidências de que esse processo envolva receptores contendo ácido siálico e integrinas, além do que tal agente viral possa entrar na célula diretamente através da membrana plasmática do enterócito ou por endocitose (CARTER; SAUNDERS, 2007; TRASK et al., 2012).

A interação vírus-receptor promove alterações conformacionais nas proteínas virais que levam a entrada na célula, e, após isso, a partícula contendo os três envoltórios proteicos (TLP) é desnudada, caracterizando a perda do envoltório mais externo e a manutenção das partículas virais contendo dois envoltórios proteicos (DLP), iniciando assim, as etapas de transcrição, tradução, replicação e maturação viral (PESAVENTO et al., 2003; CARTER; SAUNDERS, 2007).

A proteína VP1 (RNA polimerase RNA dependente) sintetiza os primeiros transcritos virais. Os RNAs de fita simples positivos servem de molde para a síntese de novos RNAs negativos que dão origem aos segmentos genômicos de RNAs dupla fita (PESAVENTO et al., 2003; TRASK et al., 2012). As proteínas NSP2 e NSP5 são responsáveis pela formação dos viroplasmas, onde ocorre o acúmulo das proteínas estruturais internas (VP1, VP2 e VP3) no interior dos mesmos, formando então o *core*. As demais fitas de RNA positivo adentram o *core* recém-formado e servem de molde para a síntese das fitas de RNA negativo, novamente por ação da VP1, levando a formação das fitas duplas de RNA no vírion. Em seguida, a VP6 é adicionada ao *core*, formando a segunda camada do capsídeo, finalizando então uma progênie de DPL. A partir daí, começa o mecanismo de tradução, e nos estágios finais de formação de novos vírus, a VP4, VP7 e NSP4 são sintetizadas no retículo endoplasmático rugoso (RER), permanecendo depois localizadas na

membrana deste. A NSP4 apresenta sítios de ligação para VP4 e para as DPLs. Após se ligarem, estes componentes formam um vírus ainda imaturo, o qual atravessa a membrana, e segue para dentro de uma vesícula (situada dentro do RE), a qual forma temporariamente um envelope contendo a VP7. Em seguida, ocorre a clivagem de moléculas de VP7 que seguem em direção à membrana para construir a camada externa do agente viral e a VP4 é adicionada. Através de estudos de microscopia eletrônica demonstrou-se que ao final do ciclo infeccioso a progênie viral é liberada por lise das células hospedeiras (PESAVENTO et al., 2003; RAMING, 2004), tal como esquematizado na Figura 4.

Figura 4 – Ciclo de replicação do rotavírus

Nature Reviews | Microbiology

Fonte: Trask et al. (2012)

2.7 TRANSMISSÃO E PATOGÊNESE DOS ROTAVÍRUS

A transmissão do RVA ocorre através da ingestão de água e/ou alimentos contaminados com fezes de animais/pessoas infectadas, podendo ocorrer importante participação de fômites como vias de transmissão. Ainda, há relatos da possibilidade da transmissão por aerossóis, principalmente quando as condições de umidade e ventilação ambiente são favoráveis (COOK et al., 2004).

Os rotavírus possuem algumas características que favorecem sua variabilidade, além de contribuir para sua prevalência, entre elas um grande número de partículas excretadas durante a infecção, relativa resistência do vírus às condições ambientais e desinfetantes e a grande diversidade de hospedeiros susceptíveis (CHANG; KIM; SAIF, 2012). Em suínos, a rotavirose caracteriza-se por comprometer animais jovens, afetando principalmente a faixa etária entre a segunda e a quinta semanas de vida (ALFIERI et al., 1999). O vírus é eliminado para o ambiente por meio das fezes tanto normais quanto diarreicas e as matrizes prenhes possuem um papel fundamental nessa disseminação, principalmente nos dias que antecedem ao parto, infectando os leitões (DEWEY et al., 2003).

Apesar da predileção por enterócitos, evidências recentes demonstraram que a infecção do rotavírus do grupo A não é limitada às células epiteliais em animais e humanos, podendo disseminar-se para o fígado, pulmão e plexo coróide (CRAWFORD et al. 2006; FENAUX et al., 2006; KIM et al., 2011), além de causar viremia (BLUTT et al., 2003).

Durante a infecção o epitélio colunar do vilo intestinal se torna cubóide, com encurtamento e achatamento das microvilosidades, hipertrofia das criptas e vacuolização e perda dos enterócitos. Ocorre posteriormente, aumento na permeabilidade do epitélio, diminuição da atividade de dissacaridases como maltase, lactase e sacarase, ainda inversão do transporte de fluidos do tecido para a luz intestinal, promovendo o quadro diarreico (RAMING, 2004). Outros mecanismos ocorrem simultaneamente, dentre eles a isquemia das vilosidades e ativação do sistema nervoso entérico (RAMING, 2004; ESTES; KAPIKIAN, 2007).

O período de incubação é de aproximadamente 24-48 horas e as infecções podem ser assintomáticas ou sintomáticas com variadas intensidades. Os sinais clínicos iniciam por volta do terceiro dia pós-infecção e os animais podem excretar o

vírus por até oito dias após o término dos sinais clínicos. Os animais apresentam, principalmente, diarreia de consistência pastosa à líquida e de curta duração, em média por três dias. A desidratação é frequente em leitões muito jovens, onde a infecção é mais grave (DEWEY et al., 2003).

2.8 DIAGNÓSTICO

Segundo Flores (2007), o diagnóstico definitivo das rotaviroses depende essencialmente da realização de metodologias de diagnóstico laboratorial, devido à similaridade da sintomatologia das infecções entéricas causadas por outros enteropatógenos, como bactérias, protozoários e vírus.

Dentre os métodos mais empregados atualmente para o diagnóstico do rotavírus, estão a EGPA, ELISA, RT-PCR, *Real time*-PCR, aglutinação em látex, microscopia eletrônica e imunocromatografia (ESTES; GREENBERG, 2013; DHIMAN et al., 2015). Em alguns casos, o sequenciamento nucleotídico confirmatório ou para genotipagem também é utilizado, já que as metodologias de caracterização molecular por *multiplex-PCR*, não contemplam todos os genótipos descritos para uma espécie animal podendo resultar em diagnóstico falso-negativo (GOUVEA et al., 1994). Além disso, cada técnica apresenta suas vantagens e limitações (TONIETTI et al., 2013b) e é necessária a revisão constante dos métodos e o direcionamento para as amostras virais típicas de cada espécie (ASANO et al., 2010; MARCONI et al., 2015)

Nas últimas décadas, houve uma grande mudança dos métodos convencionais para identificação de agentes virais para a utilização das reações em cadeia da polimerase (PCR), as quais provaram as suas vantagens sobre as técnicas previamente utilizadas, tais como a rápida detecção do (GUNSON et al., 2003). A principal vantagem dos métodos de diagnóstico molecular é o menor limiar de detecção e, portanto, elevada sensibilidade analítica para vírus comuns tais como o rotavírus e adenovírus (LOGAN; O'LEARY; O'SULLIVAN, 2006). As técnicas destacam-se ainda pelo provimento de importantes informações epidemiológicas, como distribuição sazonal e co-circulação de diferentes e novos genótipos, frequência de infecções mistas e caracterização de genótipos não identificados,

além de facilitar o monitoramento relativo à detecção de infecções interespecies (CONNER; MATSON; ESTES, 1994).

Variações da PCR, incluindo *multiplex-PCR* (SONG et al., 2006; OGAWA et al., 2009) e *multiplex nested RT-PCR* (SALEM et al., 2010), têm sido usadas para o diagnóstico da diarreia viral suína. A técnica consiste na utilização de diferentes pares de *primers* que amplificam simultaneamente múltiplas regiões de ácidos nucléicos que estão presentes na mesma amostra (RATCLIFF et al., 2007).

3 OBJETIVOS

Visando contribuir para o entendimento e prevenção das rotaviroses bem como suas possíveis relações zoonóticas e interespecies, esta pesquisa tem como objetivos:

- Caracterizar os 11 segmentos de dsRNA de rotavírus codificadores das proteínas não estruturais (NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 e NSP6) e estruturais (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 e VP7) presentes em amostras fecais suínas positivas para rotavírus através das técnicas de RT-PCR e sequenciamento genômico.
- Investigar a diversidade genotípica encontrada, dentro do escopo da epidemiologia da doença em animais e humanos, mediante emprego de análises filogenéticas.
- Identificar os aminoácidos que podem atuar na coadaptação das proteínas virais e as assinaturas genéticas que distinguem RVA suíno e humano.

4 MATERIAL E METODOS

4.1 FLUXOGRAMA DE TRABALHO

As amostras foram processadas e analisadas de acordo com o fluxograma de trabalho apresentado a seguir (Figura 5).

Figura 5 – Fluxograma dos procedimentos aplicados nas amostras de fezes de suínos e as sequências genéticas obtidas

Fonte: (SILVA, F. D. F., 2015)

Legenda: Em cinza (procedimentos realizados no LABMAS/USP-Brasil); em verde (análises de bioinformática realizadas no *Virginia Tech Carilion Research Institute-VTCRI-USA*)

4.2 AMOSTRAGEM E PREPARO DAS SUSPENSÕES FECAIS

Foram testadas 100 amostras fecais de leitões com até 60 dias de idade, com e sem diarreia, colhidas nas granjas suínolas durante os anos de 2012 e 2013. Totalizaram-se 9 rebanhos de diferentes criações comerciais de municípios do Estado de São Paulo (Limeira, Pereiras, Holambra, Fartura, São Paulo, Itu e Jaguariúna), correspondendo a 60,0% das amostras (60/100), Minas Gerais (Sete Lagoas), correspondendo a 37,0% das amostras (37/100) e Mato Grosso (Castanheira) equivalendo a 3,0% (3/100). No momento da colheita, nenhuma granja utilizava vacinação contra o rotavírus do grupo A como método de profilaxia, apesar dos estabelecimentos serem considerados altamente tecnificados.

As fezes foram colhidas diretamente do reto em potes plásticos, mantidas em gelo e posteriormente armazenadas a -20°C até o seu processamento nas reações de extração de RNA total (item 4.3). As suspensões fecais foram preparadas a 50% (p/v) em água previamente tratada com DEPC e clarificadas por centrifugação a 12.000g por 15 minutos a 4°C, sendo então utilizado o sobrenadante para as reações de extração de RNA (item 4.3).

Utilizou-se a amostra padrão NCDV (*Nebraska Calf Diarrhea Virus*) de rotavírus bovino, sorogrupo A, genotipo G6P[1], adaptada ao cultivo em monocamada de células de linhagem MA104 (células de rim de macaco Rhesus) como padrão positivo nas reações de detecção viral. Para o controle negativo foi utilizada água previamente tratada com DEPC, na proporção de um controle negativo intercalado a cada quatro amostras.

4.3 EXTRAÇÃO DO dsRNA DE ROTAVÍRUS SUÍNO

Todas as amostras foram submetidas à reação de RT-PCR, tanto para o diagnóstico inicial e, se positivas, para a caracterização genética. Nesse sentido, foram feitas extrações de RNA, a partir de 250µL do sobrenadante, empregando-se o reagente Trizol (Invitrogen®) de acordo com as instruções do fabricante. O RNA

extraído foi então ressuspendido em 17µL de água previamente tratada com DEPC e mantidos a -20°C até o seu processamento nas etapas subsequentes.

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 (RT) utilizando-se *primers* randômicos (Invitrogen® Cat. Nº. 48190-011), de acordo com o seguinte protocolo:

- Misturar 7µL da amostra de RNA extraído à solução RT-mix, que por sua vez é composta por 4µL de *First Strand Buffer* (Invitrogen®), 2µL de solução de dNTP a 10 mM, 2µL de DTT (100mM), 1µL de Random *primers* (50 ng/µL - Invitrogen® Cat. Nº. 48190-011), 3µL de água e 200 U *SuperScript III Reverse transcriptase* - Invitrogen®) para um volume final de reação de 20µL; incubando-a a seguir por 37°C /50 minutos e 70°C /15 minutos.

Em seguida, as amostras foram submetidas, como etapa inicial de diagnóstico, a amplificação de um fragmento parcial do gene codificador da proteína não estrutural NSP5 dos rotavírus do grupo A, mediante uma reação de *nested-PCR*, como previamente descrito por Salem et al. (2010).

Um total de 5µL dos produtos oriundos desta reação de *nested-PCR* 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 em banho de água com 0,5 µg/mL de brometo de etídio por 10 minutos.

Consideraram-se positivas as amostras que apresentaram no gel segmentos amplificados de tamanho igual a 208 pb correspondente àqueles descritos pelos autores (SALEM et al., 2010), tendo como referência a inclusão de *DNA ladder* 100bp (Invitrogen®) e utilizando-se como controle positivo a amostra NCDV e como negativo a água DEPC empregada em diversas etapas das reações.

As amostras que resultaram positivas a este teste, tiveram os genes NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5/6, VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 e VP7 amplificados. Foi utilizado o seguinte protocolo de PCR, onde para cada gene foram adotados diferentes pares de *primers* (Quadro 3) e ciclos de tempo/temperatura (Quadro 4):

- Misturar 2,5µL (para algumas amostras foram utilizados 5,0µL caso não tenha havido adequada amplificação do fragmento) de cDNA (oriundo da reação de RT) à solução PCR-mix, que por sua vez é composta por 1x PCR Buffer (Invitrogen[®]), 0,2 mM de cada dNTP, 0,5 pmol/µL de primer (senso e anti-senso), 1,5 mM de MgCl₂, 0,625 U de *Platinum Taq DNA Polymerase* (Invitrogen[®]), água q.s.p. 25µL; submeter ao respectivo ciclo de termociclagem.

Quadro 3 – Relação dos *primers*, respectivas sequências, posição no gene e referências utilizadas na caracterização dos 11 genes de rotavírus no presente estudo

Gene	Primer (polaridade)	Sequência (5'-3')	Posição	Referência
VP7	sBeg9 (+)	GGCTTTAAAAGAGAGAATTC	1-21	Gouvea et al., 1994
	VP7RV (-)	TGCCACCAYYTYTTCCA	1062-1036	Tonietti et al., 2013b
	End9CRW8 (-)	GGTCACATCTTACAGCTTTAACCT	1038-1062	Gouvea et al., 1994
VP4	sCon3 (+)	TTGCTCATTTATAGACA	15-32	Silva et al., 2015
	Con2 (-)	ATTTGCGACCATTTATAACC	868-887	Gentsch et al., 1992
	VP4RV (-)	TA YTGATYTCYTTCCA	813-829	Tonietti et al., 2013b
VP6	VP6F (+)	GGCTTTTAAACGAAGTCTTC	1-20	Shen et al., 1994
	VP6AS579-598 (-)	CCAGCTACYTGAATTTCTGA	579-598	Silva et al., 2014
	VP6 EMS (+)	ATAGCACCACAATCTGAAGC	348-579	Silva et al., 2014
	VP6 EMAS (-)	TCAACCTCTACATTACTGGTCTTA	784-808	Silva et al., 2014
	VP6S579-598 (+)	TCAGAAATTCARGTAGCTGG	579-598	Silva et al., 2014
	VP6R (-)	GGTCACATCCTCTCACTA	1139-1356	Shen et al., 1994
VP1	VP1FVG (+)	GGCTATTAAAGCTGTACAATGGG	1-23	Varghese et al., 2006
	VP1IRVG (-)	TAACTCTCATGAGAAAACACTGAC	663-686	Varghese et al., 2006
	VP1S1 (+)	GGCTATTAAAGCTATACAATGG	1-22	Silva et al., 2015
	VP1AS1 (-)	GAYCTATTGGAATATGAYARDA	710-731	Silva et al., 2015
	VP1S2 (+)	AARTAYAGRTATGADTAYGA	580-599	Silva et al., 2015
	VP1AS2 (-)	ATRTCATCCATDACAATGCAT	1282-1301	Silva et al., 2015
	VP1S3 (+)	AATHTATTCTGGTCTRTTCA	988-1009	Silva et al., 2015
	VP1AS3 (-)	GTRTATAATACCATAGAAATTRCTMGA	1549-1573	Silva et al., 2015
VP2	VP2FVG (+)	GGCTATTAAAGGCTCAATGGCG	1-22	Varghese et al., 2006
	VP2IRVG (-)	CTTCATCTTGAAAATAGCATCAC	663-686	Varghese et al., 2006
	VP2S1 (+)	GGCTATTAAAGGYTCAATGG	1-20	Silva et al., 2015
	VP2AS1 (-)	YTCGTCTTGAAAATATRGCATC	665-685	Silva et al., 2015
	VP2S2 (+)	CKAGRGA TGCYGGKAAAGT	622-640	Silva et al., 2015
	VP2AS2 (-)	AACWGTTAGTAACACATACC	1265-1285	Silva et al., 2015
	VP2S3 (+)	ATAGCAGCWATGYTAAGYCACG	1197-1218	Silva et al., 2015
	VP2AS3 (-)	KG TAGYATTTCCAATTARCATRCA	1812-1831	Silva et al., 2015
VP3	VP3S1 (+)	GGCTWTTAAAGCARTAYTAGTAG	1-23	Silva et al., 2015
	VP3AS1 (-)	TTTRTCTCTRAAYACACGATTTGA	608-631	Silva et al., 2015
	VP3S2 (+)	TCARAATGCAGCWACAGA	481-498	Silva et al., 2015
	VP3AS2 (-)	TTYCKOCACKCTTTCCAATC	1094-1113	Silva et al., 2015
NSP1	NSP1S (+)	GTCTTGTKRAGCCATGG	18-35	Silva et al., 2014
	NSP1AS (-)	AAGTTTACATGCTYCATTC	798-817	Silva et al., 2014
	NSP1FW531 (+)	TYAATCAGACTCCA TTTTCATT	531-552	Silva et al., 2014
	NSP1RW893 (-)	TAGTTTATRCTGCGTAAACATCT	893-916	Silva et al., 2014
	NSP1S798-817 (+)	GGAATGRAGCATGTAAACTT	798-817	Silva et al., 2014
	NSP1AScomp (-)	GGCGCTACTCTAGTGACAG	1528-1545	Silva et al., 2014
NSP2	GEN-NSP2F (+)	GGCTTTTAAAGCGTCTCAG	1-19	Matthijnssens et al., 2008a
	NSP2-RW707 (-)	CTCTRTAGTGACCTTTACCATG	707-728	Barbosa et al., 2013
	NSP2-FW707 (+)	CATGGTAAAGGTCACTAYAGAG	707-728	Barbosa et al., 2013
	NSP2-RW975 (-)	TCCATYTTTCTATCAGTTGACA	954-975	Barbosa et al., 2013
NSP3	NSP3S (+)	GATGCTCAAGATGGAAGTCTAC	25-45	Silva et al., 2014
	NSP3AS641 (-)	TGAAGAGAGTACATATTTTCAAT	632-654	Silva et al., 2014
	NSP3S374-396 (+)	ATGAGAGTACTTAATGCGWTGTTT	374-396	Silva et al., 2014
	NSP3AS (-)	AGCTTTTAAAGATAATGTGCTCA	1012-1032	Silva et al., 2014
NSP4	10Beg16 (+)	TGTTCCGAGAGAGCGCGTG	16-34	Lee et al., 2000
	10End722C (-)	GACCATTCCTTCCATTAAC	722-740	Lee et al., 2000
NSP5	GEN_NSP5F (+)	GGCTTTTAAAGCGCTACAG	1-19	Matthijnssens et al., 2008a
	GEN_NSP5R (-)	GGTCACAAAACGGGAGT	664-648	Matthijnssens et al., 2008a

Fonte: Adaptado de Silva et al. (2015)

Quadro 4 – Condições de termociclagem para a amplificação dos 11 genes dos rotavírus

Genes	Programa de termociclagem
NSP1, NSP3, VP1, VP3	95°C - 3 min/40 ciclos de [95°C - 1 min; 50°C - 1,5 min; 72°C - 1 min] / 72°C - 10 min
NSP2, NSP5	94°C - 3 min/40 ciclos de [94°C - 45 s; 45°C - 45 s; 72°C - 2,5 min] / 72°C - 7 min
NSP4	95°C - 3 min/30 ciclos de [95°C - 45 s; 49°C - 30 s; 72°C - 1,5 min] / 72°C - 10 min
VP2	95°C - 3 min/40 ciclos de [95°C - 1 min; 55°C - 1,5 min; 72°C - 1 min] / 72°C - 10 min
VP4, VP7	94°C - 3 min/40 ciclos de [94°C - 1 min; 50°C - 1,5 min; 72°C - 1 min] / 72°C - 10 min
VP6	94°C - 3 min/40 ciclos de [94°C - 1 min; 42°C - 2 min; 72°C - 1 min] / 72°C - 10 min

Fonte: Adaptado de Silva et al. (2015)

Após as reações de termociclagem, 10 µL de cada produto amplificado foram misturados ao *Blue Juice Loading Buffer* (Invitrogen®), analisados mediante eletroforese em gel de agarose a 1,5% (p/v) em tampão TRIS-borato 0,045M; EDTA 0,001M pH 8,0 e corados com de brometo de etídio a 0,5 µg/mL.

4.5 REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO NUCLEOTÍDICO

Os produtos da PCR foram purificados diretamente do gel de agarose quando houve a presença de bandas adicionais além da específica (Quadro 2), utilizando-se o *kit Purelink Quick Gel Extraction* (Invitrogen®). No caso de uma única banda de tamanho compatível, utilizou-se o reagente *ExoSap-it* (USB®). Em ambas as situações, seguiu-se o protocolo preconizado pelos respectivos fabricantes.

A reação de sequenciamento foi realizada diretamente nas placas de 96 poços (modelo *MicroAmp Optical 96* - Applied Biosystems®), contendo em cada um deles 2µL de BigDye 3.1 (Applied Biosystems®), 1,5µL de 5x *Sequencing buffer* (Applied Biosystems®), 5 pmol/µL de cada primer senso ou antisenso e 6µL do DNA alvo para uma reação final de 10µL. Ambas as reações foram levadas ao termociclador *Eppendorf® Mastercycler Gradient* a 96°C / 1 minuto, em seguida a 40 ciclos de 96°C / 15 segundos, 50°C / 15 segundos e 60°C / 4 minutos, com rampa de 1°C por segundo em todas as etapas.

A seguir, os terminadores não incorporados à reação de sequenciamento de DNA, foram removidos mediante o uso do reagente *BigDye XTerminator Purification Kit* (Applied Biosystems®), de acordo com o protocolo do fabricante.

Finalmente, os produtos tiveram suas sequências nucleotídicas definidas em equipamento *ABI-3500 Genetic Analyser* (Applied Biosystems®), de acordo com instruções do fabricante.

4.6. ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS

Realizou-se uma inspeção visual nos eletroferogramas das sequências geradas para cada fita senso e antisenso através do aplicativo *FinchTV* v. 1.4.0. Posteriormente, foram editadas com o programa *Bioedit* v.7.2.5 (HALL, 1999) para checagem de eventuais discrepâncias entre cada uma das fitas sequenciadas, e em seguida foram alinhadas entre si e com outras homólogas recuperadas do *Genbank*, utilizando-se o *software CLUSTAL W* v.2.1 (LARKIN et al., 2007).

Para a caracterização dos genótipos dos RVA obtidos neste estudo, além das árvores filogenéticas geradas (item 4.7), utilizou-se o *software* RotaC 2.0 (MAES et al., 2009).

4.7 ANÁLISE FILOGENÉTICA

Para cada um dos genes de rotavírus pesquisados realizou-se inicialmente o cálculo da matriz de similaridade de nucleotídeos utilizando-se o *software* BioEdit v. 7.0.5 (HALL, 1999).

As inferências filogenéticas das sequências nucleotídicas completas e parciais dos genes codificadores das proteínas não estruturais - NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5/6 - e estruturais - VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 e VP7 - dos rotavírus foram realizadas mediante uso do programa MEGA versão 6.0.6 (TAMURA et al., 2011). As árvores foram construídas através do critério de *maximum likelihood*, sendo os modelos de substituição nucleotídica definidos para cada gene

separadamente de acordo com o *Bayesian Information Criterion* (BIC), fornecido pelo próprio *software*, como indicado a seguir (gene/modelo): VP7/TN93; VP4/GTR; VP6/T92; VP1/TN93; VP2/TN93; VP3/T92; NSP1/GTR; NSP2/T92; NSP3/T92; NSP4/HKW e NSP5/T92. O suporte estatístico foi obtido pelos valores de *bootstrap* a partir de 100 repetições, cujos valores maiores ou iguais a 70 foram apresentados próximos aos nós.

4.8 ANÁLISES DE BIOINFORMÁTICA REALIZADAS NO VTCRI

4.8.1 Alinhamentos das sequências nucleotídicas e filogenias

Para inicialmente identificar os sítios de mudanças de aminoácidos que diferenciam RVA suíno e humano além de sítios de substituição que covariam entre as proteínas, as sequências de 9 genes virais (VP1, VP2, VP3, VP6, NSP1, NSP2, NSP3, NSP4 e NSP5) das amostras de rotavírus suínos já definidas na primeira etapa deste estudo foram comparadas com a maioria das sequências (aproximadamente 1877) de RVA suíno e humano pertencentes ao genotipo 1 (*Wa-like*) disponíveis no *Genbank*. Os genes VP4 e VP7 não foram analisados, a princípio, devido à grande variabilidade genética encontrada nos mesmos.

Os alinhamentos das sequências nucleotídicas e filogenias foram construídos com o *software Geneious Pro v5.6.5* (KEARSE et al., 2012) usando os algoritmos *Clustal W* e *PhyML*. As sequências foram trimadas dentro da *Open Reading Frame* e organizadas de acordo com cada genotipo. As árvores filogenéticas foram construídas para cada gene viral e assim permitindo observar os agrupamentos e possíveis sublinhagens dentro de cada espécie e genotipo. Nas árvores, os grupos monofiléticos foram colapsados usando o *software FigTree v1.4* e as figuras foram coloridas usando o *software Adobe Illustrator CS5* (Adobe Systems).

4.8.2 Identificação dos sítios de aminoácidos e covariação

Os alinhamentos de nucleotídeos obtidos no item 4.8.1 foram traduzidos para aminoácidos no próprio *software Geneious Pro* v5.6.5 usando os algoritmos *Clustal W* e *BLOSUM matrix*. Neste estudo, as análises de covariância e identificação de sítios de aminoácidos não foram realizadas para os genes NSP4 e NSP5 de forma completa devido a necessidade de se adicionar mais sequências de origem humana que ainda estão sendo analisadas no *VTCRI*. Dessa forma, os resultados obtidos são apenas para os genes VP1, VP2, VP3, VP6, NSP1, NSP2 e NSP3. Para cada alinhamento individual das sequências proteicas de RVA suíno e humano buscou-se manualmente possíveis sítios de mudanças de aminoácidos específicos de cada uma das espécies comparadas, caracterizando as assinaturas genéticas.

Para identificar as redes de covariância em algumas proteínas do genoma dos RVA em suínos, as sequências de aminoácidos de cada proteína viral das amostras sequenciadas foram alinhadas consecutivamente em ordem de VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3, perfazendo um total de 21 combinações possíveis (por ex., VP6-VP1, VP6-VP2, VP6-VP3, etc.). Os alinhamentos das sequências foram exportados do *Geneious Pro* v5.6.5 como arquivos individuais no formato NEXUS e então analisados para covariação de aminoácidos usando o servidor web MISTIC (<http://mistic.leloir.org.ar/>) (SIMONETTI et al., 2013). O ponto de corte para cada uma das combinações variou de 55,3 (o maior nível de covariação) a -12,5 (o menor nível de covariação). Apenas conexões intermoleculares com ponto de corte ≥ 30 foram quantificadas (SIMONETTI et al., 2013).

5 RESULTADOS

5.1 REAÇÕES DE RT-PCR E SEQUENCIAMENTO NUCLEOTÍDICO

Das 100 amostras fecais de suínos, submetidas à triagem por meio da PCR com os *primers* descritos por Salem et al. (2010), 24 delas (24/100) apresentaram-se positivas para a presença de rotavírus, provenientes de 5 municípios diferentes nos estados de São Paulo, Mato Grosso e Minas Gerais. Destas, foi possível amplificar e sequenciar todos os 11 genes dos rotavírus em 12 delas (12/24 ou 50%), com os *primers* desenhados neste estudo e os descritos por outros autores (Quadro 3). As 12 amostras, caracterizadas como diarreicas, provenientes de diferentes rebanhos e utilizadas para o sequenciamento do genoma completo dos rotavírus neste estudo estão descritas no Quadro 3. Os respectivos *accession numbers* das sequências para cada um dos genótipos das 12 amostras estão descritos no Apêndice A.

Quadro 5 - Relação dos municípios de origem das amostras selecionadas para o sequenciamento dos 11 genes de RVA

Amostra	Município/Estado
ROTA01	Castanheira-MT
ROTA06	Fartura-SP
ROTA07	Castanheira-MT
ROTA08	Fartura-SP
ROTA09	Itu-SP
ROTA10	Itu-SP
ROTA11	Itu-SP
ROTA12	Itu-SP
ROTA14	Itu-SP
ROTA15	Itu-SP
ROTA17	Pereiras-SP
ROTA24	Pereiras-SP

Fonte: (SILVA, F. D. F., 2015).

5.2 CONSTELAÇÕES GENOTÍPICAS

De acordo com o Quadro 6, seis diferentes constelações genotípicas foram definidas para as 12 amostras de RVA suíno sequenciadas neste estudo. Além dos genótipos G e P detectada nos genes codificantes VP7 e VP4 (G3, G5, G9, G11, P[6], P[13] e P[23]), a seguinte constelação genotípica foi caracterizada para os outros nove genes: I5-R1-C1-M1-A8-N1-T1/T7-E1-H1. Embora o genótipo T7 do gene codificante NSP3 tenha sido detectado na maioria das amostras (n=7/12), o genótipo T1 também foi relatado nas cepas deste estudo (n=5/12).

Quadro 6 – Constelações genotípicas e relações genéticas de RVA em suínos detectados neste estudo e amostras de RVA em humanos

Amostra	VP7	VP4	VP6	VP1	VP2	VP3	NSP1	NSP2	NSP3	NSP4	NSP5
RVA/Pig-wt/BRA/ROTA01/2013/G5P[13]	G5	P[13]	I5	R1	C1	M1	A8	N1	T7	E1	H1
RVA/Pig-wt/BRA/ROTA06/2013/G11P[6]	G11	P[6]	I5	R1	C1	M1	A8	N1	T7	E1	H1
RVA/Pig-wt/BRA/ROTA07/2013/G5P[13]	G5	P[13]	I5	R1	C1	M1	A8	N1	T7	E1	H1
RVA/Pig-wt/BRA/ROTA08/2013/G3P[6]	G3	P[6]	I5	R1	C1	M1	A8	N1	T7	E1	H1
RVA/Pig-wt/BRA/ROTA09/2013/G3P[13]	G3	P[13]	I5	R1	C1	M1	A8	N1	T7	E1	H1
RVA/Pig-wt/BRA/ROTA10/2013/G9P[23]	G9	P[23]	I5	R1	C1	M1	A8	N1	T1	E1	H1
RVA/Pig-wt/BRA/ROTA11/2013/G9P[23]	G9	P[23]	I5	R1	C1	M1	A8	N1	T1	E1	H1
RVA/Pig-wt/BRA/ROTA12/2013/G9P[23]	G9	P[23]	I5	R1	C1	M1	A8	N1	T1	E1	H1
RVA/Pig-wt/BRA/ROTA14/2013/G9P[23]	G9	P[23]	I5	R1	C1	M1	A8	N1	T1	E1	H1
RVA/Pig-wt/BRA/ROTA15/2013/G9P[23]	G9	P[23]	I5	R1	C1	M1	A8	N1	T1	E1	H1
RVA/Pig-wt/BRA/ROTA17/2013/G5P[6]	G5	P[6]	I5	R1	C1	M1	A8	N1	T7	E1	H1
RVA/Pig-wt/BRA/ROTA24/2013/G5P[6]	G5	P[6]	I5	R1	C1	M1	A8	N1	T7	E1	H1
RVA/Pig-wt/CAN/F8-4/2006/G2P6[7]	G2	P[6/7]	I5	R1	C1	M1	A8	N1	T7	E1	H1
RVA/Pig-tc/VEN/A131/1988/G3P[7]	G3	P[7]	I5	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Pig-t/THA/CMP48/08/2008/G3P[23]	G3	P[23]	I5	R1	C1	M1	A8	N1	T1	E1	H1
RVA/Pig-tc/USA/Gottfried/1983/G4P[6]	G4	P[6]	I1	R1	C1	M1	A8	N1	T1	E1	H1
RVA/Pig-tc/USA/OSU/1977/G5P[7]	G5	P[7]	I5	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Pig-wt/THA/CMP45/2008/G9P[23]	G9	P[23]	I5	R1	C1	M1	A8	N1	T7	E1	H1
RVA/Pig-tc/KOR/PRG921/2006/G9P[23]	G9	P[23]	I5	R1	C1	M1	A8	N1	T1	E1	H1
RVA/Pig-wt/ITA/3BS/2009/G9P[23]	G9	P[23]	I5	R1	C1	M1	A8	N1	T1	E1	H1
RVA/Pig-tc/MEX/YM/1983/G11P[7]	G11	P[7]	I5	R1	C1	M1	A8	N1	T1	E1	H1
RVA/Pig-tc/VEN/A253/1988/G11P[7]	G11	P[7]	I5	R1	C2	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Pig-wt/CAN/F6-4/2006/G11P[13]	G11	P[13]	Ix	Rx	Cx	M1	A8	N1	T7	Ex	Hx
RVA/Pig-tc/IND/RU172/2002/G12P[7]	G12	P[7]	I5	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Hum-wt/BRA/HSP180/1999/G4P[6]	G4	P[6]	I1	R1	C1	M1	A8	N1	T7	E1	H1
RVA/Hum-tc/BRA/IAL28/1992/G5P[8]	G5	P[8]	I5	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Hum-wt/BRA/HST327/1999/G4P[6]	G4	P6	Ix	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Hum-wt/BEL/BE2001/2009/G9P[6]	G9	P[6]	I5	R1	C1	M1	A8	N1	T7	E1	H1
RVA/Hum-tc/THA/Mc345/1989/G9P[19]	G9	P[19]	I5	R1	C1	M1	A8	N1	T1	E1	H1
RVA/Hum-Wt/IND/RMC321/1990/G9P[19]	G9	P[19]	I5	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
RVA/Hum-wt/ARG/Arg4605/2006/G4P[6]	G4	P[6]	I1	R1	C1	M1	A8	N1	T7	E1	H1
RVA/Hum-wt/JPN/Ryuky u/2011/G5P[6]	G5	P[6]	I5	R1	C1	M1	A8	N1	T1	E1	H1

Fonte: Adaptado de Silva et al. (2015)

Legenda: VP- Proteína estrutural; NSP- Proteína não estrutural. As amostras brasileiras detectadas neste estudo estão em negrito. A constelação genotípica Wa está indicada em verde; a constelação genotípica DS-1 está indicada em vermelho; genótipos tipicamente suínos estão indicados em azul.

5.3 ANÁLISES DOS GENES CODIFICANTES

5.3.1 Análise dos genes codificantes VP7 e VP4

A sequência parcial da ORF (74% - nucleotídeos 117 a 839) do gene codificante VP7 foi caracterizada para todas as 12 amostras de RVA deste estudo e quando comparadas com rotavírus pertencentes a diferentes genótipos em suínos, humanos e bovinos (MATTHIJNSSENS et al., 2011), agruparam-se na árvore filogenética com cepas pertencentes aos genótipos G3, G5, G9 e G11 (Figura 9).

A diversidade intragenotípica foi maior nos genótipos G3 e G5 pertencentes ao gene VP7 e menor para o genótipo G9. Em relação às cepas de genótipo G3 caracterizadas neste estudo (Apêndice B), a amostra RVA/Pig-wt/BRA/ROTA09/2013/G3P[13] agrupou-se distantemente das amostras de mesmo genótipo de origem humana (85,6-87,2% de similaridade nucleotídica) e foi mais estreitamente relacionada à amostra contemporânea RVA/Pig-wt/BRA/PGRV4/2012/G3P[13] (99,0% de similaridade nucleotídica), a qual foi isolada recentemente no Brasil (TONIETTI et al., 2013b). Por outro lado, a outra cepa caracterizada neste estudo como genótipo G3, RVA/Pig-wt/BRA/ROTA08/2013/G3P[6] teve somente 84,9% de similaridade nucleotídica com a amostra RVA/Pig-wt/BRA/ROTA09/2013/G3P[13], sendo que a maior identidade ocorreu com a amostra suína descrita na Tailândia (RVA/Pig-wt/THA/CMP48/08/2008/G3P[23] (88,2%) (OKITSU et al., 2013). As amostras RVA/Pig-wt/BRA/ROTA07/2013/G5P[6] e RVA/Pig-wt/BRA/ROTA01/2013/G5P[6] agruparam-se com outras amostras pertencentes ao genótipo G5 e tiveram maior similaridade nucleotídica com a amostra suína RVA/Pig-wt/BEL/12R008/2012/G5P[6] (88,6-88,9%) (Apêndice C), detectada na Bélgica (THEUNS et al., 2014). Ao contrário, a amostra RVA/Pig-wt/BRA/ROTA17/2013/G5P[6] apresentou maior similaridade com a amostra humana RVA/Human-tc/BRA/IAL28/1992/G5P[8] (92,1%) (HEIMAN et al., 2008). Por sua vez, a última amostra caracterizada neste estudo como genótipo G5 RVA/Pig-wt/BRA/ROTA24/2013/G5P[6] teve alta porcentagem de similaridade com a antiga cepa suína RVA/Pig-tc/USA/OSU/1977/G5P9[7] (94,7%) (MATTHIJNSSENS et al., 2010a). A similaridade

genética entre as sequências do gene codificante VP7 de RVA suíno e humano também foi demonstrado dentro do genotipo G9 (Apêndice D). Neste estudo, as 5 cepas brasileiras detectadas como pertencentes ao genotipo G9 apresentaram 92,7% de similaridade com a cepa de RVA humana detectada na Índia (RVA/Human-wt/IND/RMC321/1990/G9P[19] (VARGHESE et al., 2004), assim como, foram altamente similares (91,8-92,7%) com várias cepas de origem humana detectadas no Brasil (RVA/Human-wt/BRA/es12588/06/2006/G9P[8], RVA/Human-wt/BRA/BA201/XXXXG9P[X] e RVA/Human-wt/BRA/R136/1998/G9P[X]) (SANTOS et al., 2002, 2005; TORT et al., 2010). A baixa diversidade intragenotípica entre as amostras pertencentes ao genotipo G9 detectadas neste estudo pode ser comprovada pelo alto valor de similaridade nucleotídica quando comparadas entre si (99,7-100%). A amostra RVA/Pig-wt/BRA/ROTA06/2013/G11P[6] caracterizada neste estudo agrupou-se com ambas cepas suínas e humanas pertencentes ao genotipo G11, mas tiveram maior similaridade nucleotídica (91,8%) (Apêndice E) com a amostra suína RVA/Pig-wt/CAN/F6-4/2006/G11P[13], a qual foi detectada em 2006 no Canadá (MARTEL-PARADIS et al., 2013).

Para o gene codificante VP4, a análise filogenética foi realizada através da sequência parcial da ORF, compreendendo parte da região do gene VP8* e VP5* (27% - nucleotídeos 133 a 765). Os resultados mostraram que as amostras de RVA deste estudo agruparam-se com os genotipos P[6], P[13] e P[23], os quais são comumente ou exclusivamente associados com RVA em suíno (Figura 10). A diversidade intragenotípica foi evidente no genotipo P[6]. As 4 amostras caracterizadas neste estudo como genotipo P[6] (RVA/Pig-wt/BRA/ROTA06/2013/G11P[6], RVA/Pig-wt/BRA/ROTA08/2013/G3P[6], RVA/Pig-wt/BRA/ROTA17/2013/G5P[6], RVA/Pig-wt/BRA/ROTA24/2013/G5P[6]) tiveram maior similaridade nucleotídica (93,1-96,1%) (Apêndice F) com a amostra suína recentemente descrita no Brasil (RVA/Pig-wt/BRA/PGRV29/2011/GXP[6]) (TONIETTI et al., 2013b). Ainda, estas 4 amostras apresentaram também maior similaridade nucleotídica com a amostra de origem humana detectada na Argentina (RVA/Human-wt/ARG/Arg4605/2006/G4P[6]) (91,1-93,8%) do que quando comparadas com amostras humanas caracterizadas no Brasil (DEGIUSEPPE et al., 2013). Das 3 amostras caracterizadas neste estudo como genotipo P[13], duas (RVA/Pig-wt/BRA/ROTA01/2013/G5P[13] e RVA/Pig-wt/BRA/ROTA07/2013/G5P[13]), revelaram alta similaridade com a amostra suína

brasileira RVA/Pig-wt/BRA/PGRV20/2012/G3P[13] e ao contrário, a outra amostra P[13] deste estudo RVA/Pig-wt/BRA/ROTA09/2013/G3P[13], obteve maior similaridade nucleotídica (98,6%) com as amostras RVA/Pig-wt/BRA/PGRV4/2012/G3P[13], RVA/Pig-wt/BRA/PGRV2/2012/G3P[13] e RVA/Pig-wt/BRA/PGRV8/2012/G3P[13] (Apêndice G) (TONIETTI et al., 2013b). Em relação ao genotipo P[23], todas as amostras detectadas neste estudo foram altamente similares entre si (99,2%-100%), caracterizando a baixa variabilidade intragenotípica observada neste genotipo e tiveram alta similaridade nucleotídica com a amostra RVA/Pig-tc/VEN/A34/1985/G5P[23] (90,8%-91,1%) (Apêndice H), detectada na Venezuela (LIPRANDI et al., 2003).

5.3.2 Análise dos genes codificantes VP6, VP1, VP2 e VP3

Para o gene codificante VP6, a análise filogenética foi baseada no sequenciamento completo da ORF (100% - nucleotídeos 25 a 1218) das 12 amostras de suínos caracterizadas neste estudo. As cepas foram definidas como genotipo I5 (Figura 11), considerado comum em RVA detectado em suíno. As sequências do gene codificante VP6- I5 deste estudo foram altamente similares entre si (92,0-100%) além de apresentarem alta similaridade nucleotídica (93,0-94,1%) com a cepa humana RVA/Human-tc/THA/Mc323/1989/G9P[19] a qual foi demonstrado tendo uma matriz genética suína (93,0-94,1%) (Apêndice I) (GHOSH et al., 2012b).

A análise filogenética dos genes codificantes VP1, VP2 e VP3 mostrou que todas as 12 amostras caracterizadas neste estudo foram assinaladas como pertencentes ao genotipo 1 (R1, C1 e M1, respectivamente). A análise da sequência parcial da ORF (47% - nucleotídeos 49 a 1569) do gene codificante VP1, mostrou a presença de 2 principais *sub-clusters* dentro do genotipo R1 (Figura 12). Assim, as cepas RVA/Pig-wt/BRA/ROTA12/2013/G9P[23], RVA/Pig-wt/BRA/ROTA14/2013/G9P[23], RVA/Pig-wt/BRA/ROTA15/2013/G9P[23], RVA/Pig-wt/BRA/ROTA11/2013/G9P[23], RVA/Pig-wt/BRA/ROTA10/2013/G9P[23] e RVA/Pig-wt/BRA/ROTA24/2013/G9P[23] agruparam-se juntas em um ramo e apresentaram

maior similaridade nucleotídica (92,7-94,0%) (Apêndice J) com a antiga cepa RVA/Pig-tc/USA/OSU/1975/G5P9[7] (MATTHIJNSSENS et al., 2010a).

De uma forma geral, alta diversidade genética foi observado entre as cepas suínas caracterizadas neste estudo, pertencentes ao genotipo R1 do gene codificante VP1 e as amostras RVA/Pig-wt/BRA/ROTA17/2013/G5P[6], RVA/Pig-wt/BRA/ROTA08/2013/G3P[6], RVA/Pig-wt/BRA/ROTA09/2013/G3P[13] apresentaram maior similaridade nucleotídica (90,4-92,2%) com a antiga cepa RVA/Pig-tc/USA/Gottfried/1983/G4P[6] (MATTHIJNSSENS et al., 2010a). Por outro lado, as 3 amostras restantes caracterizadas como genotipo R1 dentro do gene codificante VP1, RVA/Pig-wt/BRA/ROTA06/2013/G11P[6], RVA/Pig-wt/BRA/ROTA01/2013/G5P[13] e RVA/Pig-wt/BRA/ROTA07/2013/G5P[13] agruparam-se em um ramo separado juntamente com cepas de RVA relatado em humanos. Este ramo teve maior similaridade nucleotídica com a cepa de RVA suína RVA/Pig-wt/ITA/3BS/2009/G9P[23] (92,5%) (Apêndice J), a qual apresentou evidente variação intragenotípica através do seu genoma (MONINI et al., 2014).

A análise filogenética da sequência parcial da ORF dos genes codificantes VP2 (50% - nucleotídeos 59 a 1393) e VP3 (41% - nucleotídeos 38 a 1072) mostrou que as cepas caracterizadas neste estudo agruparam-se no genotipo C1 (Figura 13) e no genotipo M1 (Figura 14), respectivamente. As amostras do gene codificante VP2 agruparam-se em dois ramos separados os quais contem na sua maioria sequências de RVA suíno e poucas amostras de RVA detectado em humano. As amostras suínas brasileiras caracterizadas neste estudo tiveram maior similaridade nucleotídica (91,9-94,8%) (Apêndice K) com a antiga cepa RVA/Pig-tc/USA/OSU/1977/G5P[7] (MATTHIJNSSENS et al., 2010a). Similarmente, a análise filogenética revelou que o gene codificante VP3 de 10 amostras caracterizadas neste estudo agruparam-se próximas e foram mais relacionadas (92,4-94,9% de similaridade nucleotídica) (Apêndice L) com a amostra RVA/Human-wt/ARG/Arg4605/2006/G4P[6], enquanto que as outras 2 cepas restantes (RVA/Pig-wt/BRA/ROTA24/2013/G5P[6] e RVA/Pig-wt/BRA/ROTA08/2013/G3P[6], foram mais relacionadas com outras amostras suínas detectadas na América do Norte (MATTHIJNSSENS et al., 2010a; DEGIUSEPPE et al., 2013).

5.3.3 Análise dos genes codificantes NSP1, NSP2 e NSP3

A análise filogenética da ORF parcial (70% - nucleotídeos 22 a 1056) das sequências do gene codificante NSP1, demonstrou que todas as 12 amostras suínas caracterizadas neste estudo pertenceram ao genótipo A8 (Figura 15), sendo observada a presença de diferentes *sub-clusters*. Especificamente, as amostras RVA/Pig-wt/BRA/ROTA24/2013/G5P[6], RVA/Pig-wt/BRA/ROTA09/2013/G3P[13] e RVA/Pig-wt/BRA/ROTA17/2013/G5P[6] formaram um *sub-cluster* com a amostra humana caracterizada no Brasil (RVA/Human-wt/BRA/HSP180/1999/G4P[6]) (91,1-94,1% de similaridade nucleotídica) (Apêndice M), a qual foi sugerido ser um vírus recombinante (MAESTRI et al., 2012). Além disso, o restante das amostras caracterizadas neste estudo agrupou-se em outro ramo com outras cepas de genótipo A8 relatadas em suínos e humanos, mas foram mais proximamente relacionadas (86,2-93,5% de similaridade nucleotídica) às cepas de origem humana RVA/Human-wt/ARG/Arg4605/2006/G4P[6] e RVA/Human-wt/ARG/Arg4671/2006/G4P[6] (DEGIUSEPPE et al., 2013).

Através da análise filogenética da ORF completa (100% - nucleotídeos 54 a 947) das sequências do gene codificante NSP2, todas as amostras caracterizadas neste estudo foram definidas como genótipo N1, sendo demonstrada uma baixa variabilidade genética para este genótipo (Figura 16). As cepas RVA/Pig-wt/BRA/ROTA17/2013/G5P[6], RVA/Pig-wt/BRA/ROTA06/2013/G11P[6], RVA/Pig-wt/BRA/ROTA09/2013/G3P[13], RVA/Pig-wt/BRA/ROTA11/2013/G9P[23], RVA/Pig-wt/BRA/ROTA10/2013/G9P[23], RVA/Pig-wt/BRA/ROTA12/2013/G9P[23], RVA/Pig-wt/BRA/ROTA14/2013/G9P[23] e RVA/Pig-wt/BRA/ROTA15/2013/G9P[23], foram mais proximamente relacionadas entre si (94,7-100%) (Apêndice N) e mais distantemente relacionadas com as 4 amostras restantes de genótipo N1 caracterizadas neste estudo (RVA/Pig-wt/BRA/ROTA08/2013/G3P[6], RVA/Pig-wt/BRA/ROTA01/2013/G5P[13], RVA/Pig-wt/BRA/ROTA07/2013/G5P[13] e RVA/Pig-wt/BRA/ROTA24/2013/G5P[6]) (86,0-88,1%). Em um dos *sub-clusters*, estas últimas 4 amostras foram mais proximamente relacionadas (94,7-99,4% de similaridade nucleotídica) com a cepa RVA/Pig-wt/BRA/SWRV7/2012/GXP[X], recentemente descrita no Brasil (BARBOSA et al., 2013). No outro sub-cluster agruparam-se as 8 amostras restantes caracterizadas neste estudo como genótipo N1 e foram

altamente relacionadas (94,7-100%) com a cepa RVA/Pig-wt/BRA/SWRV5/2012/GXP[X].

Em relação ao gene codificante da proteína NSP3 das amostras de suíno caracterizadas neste estudo, a análise genética da ORF completa (100% - nucleotídeos 37 a 942) mostrou que a maioria das amostras (n=7/12) exibiu o genotipo T7, enquanto que as outras 5 foram classificadas como genotipo T1 (Figura 17). Um sub-cluster foi formado dentro do genotipo T1 com as cepas RVA/Pig-wt/BRA/ROTA14/2013/G9P[23], RVA/Pig-wt/BRA/ROTA10/2013/G9P[23], RVA/Pig-wt/BRA/ROTA15/2013/G9P[23], RVA/Pig-wt/BRA/ROTA12/2013/G9P[23] e RVA/Pig-wt/BRA/ROTA11/2013/G9P[23], as quais foram altamente relacionadas entre si (100% de similaridade nucleotídica) (Apêndice O). E quando comparadas com amostras caracterizadas em outros países, estas cepas se mostraram mais proximamente relacionadas (93,8% de similaridade nucleotídica) com a histórica amostra suína RVA/Pig-tc/USA/OSU/1977/G5P[7] (MATTHINJNSSENS et al., 2010a).

As amostras caracterizadas como genotipo T7 foram um pouco menos relacionadas entre si (90,8-99,7% de similaridade nucleotídica) (Apêndice P), quando comparadas com as cepas de genotipo T1 deste estudo. Interessantemente, o gene codificante NSP3 da amostra RVA/Pig-wt/BRA/ROTA17/2013/G5P[6] agrupou-se juntamente com a amostra humana RVA/Human-wt/ARG/Arg4605/2006/G4P[6] (DEGIUSEPPE et al., 2013). Além disso, as amostras RVA/Pig-wt/BRA/ROTA01/2013/G5P[13], RVA/Pig-wt/BRA/ROTA07/2013/G5P[13], RVA/Pig-wt/BRA/ROTA09/2013/G3P[13], RVA/Pig-wt/BRA/ROTA24/2013/G5P[6], RVA/Pig-wt/BRA/ROTA08/2013/G3P[6] e RVA/Pig-wt/BRA/ROTA06/2013/G11P[6], foram mais relacionadas (91,9-95,5% de similaridade nucleotídica) com a amostra humana RVA/Human-wt/BRA/HSP180/1999/G4P[6] (MAESTRI et al., 2012).

5.3.4 Análise dos genes codificantes NSP4 e NSP5

A análise filogenética das sequências parciais da ORF do gene codificante NSP4 (98% - nucleotídeos 18 a 560), demonstrou que todas 12 amostras testadas neste estudo foram caracterizadas como genotipo E1 (Figura 18), o qual apresentou

de uma forma geral uma baixa diversidade genética. Assim, as amostras RVA/Pig-wt/BRA/ROTA10/2013/G9P[23], RVA/Pig-wt/BRA/ROTA11/2013/G9P[23], RVA/Pig-wt/BRA/ROTA12/2013/G9P[23], RVA/Pig-wt/BRA/ROTA14/2013/G9P[23] e RVA/Pig-wt/BRA/ROTA15/2013/G9P[23], apresentaram similaridade nucleotídica máxima (100%) (Apêndice Q) quando comparadas entre si e formaram um *cluster* com cepas de origem humana caracterizadas na América do Sul (HEIMAN et al., 2008; STUPKA; DEGIUSEPPE; PARRA, 2012). Estas amostras foram ainda mais proximamente relacionadas (88,8%) com a cepa RVA/Human-wt/BEL/B3458/2003/G9P[8] (MATTHIJNSSENS et al., 2008a). O outro sub-cluster foi formado com as amostras RVA/Pig-wt/BRA/ROTA17/2013/G5P[6], RVA/Pig-wt/BRA/ROTA09/2013/G3P[13], RVA/Pig-wt/BRA/ROTA06/2013/G11P[6], RVA/Pig-wt/BRA/ROTA08/2013/G3P[6], RVA/Pig-wt/BRA/ROTA24/2013/G5P[6], RVA/Pig-wt/BRA/ROTA01/2013/G5P[13] e RVA/Pig-wt/BRA/ROTA07/2013/G5P[13], as quais se agruparam com outras cepas de origem suína descritas no Brasil (93,8-96%) (CUNHA, 2011).

Similarmente, a análise filogenética das sequências da ORF parcial do gene codificante NSP5/6 (93% - nucleotídeos 52 a 552) demonstrou que de uma forma geral, houve uma baixa diversidade genética dentro do genotipo H1 (Figura 19). Assim, as amostras suínas caracterizadas neste estudo foram altamente relacionadas entre si (95,2-100%) (Apêndice R) e formaram clusters com outras cepas de origem suína e humana. A maioria destas amostras foram mais relacionadas (98,9-100% de similaridade nucleotídica) com outras amostras caracterizadas no Brasil, RVA/Pig-wt/BRA/SWRV1/2012/GXP[X], RVA/Pig-wt/BRA/SWRV2/2012/GXP[X], RVA/Pig-wt/BRA/SWRV4/2012/GXP[X] e RVA/Pig-wt/BRA/SWRV6/2012/GXP[X] (BARBOSA et al., 2013).

5.4 FILOGENIAS, ASSINATURAS GENÉTICAS E COVARIAÇÃO

De uma forma geral, as árvores filogenéticas construídas para cada gene viral com a maior parte das sequências disponíveis no *Genbank*, mostraram que as sequências de RVA suíno agruparam-se separadamente daquelas de RVA em

humanos pertencentes à constelação 1 (*Wa-like*), mesmo quando compartilhando os mesmos genótipos (R1, C1, M1, N1 e H1) (Figuras 6A, 6B e 6C). Além disso, através dos alinhamentos englobando as sequências proteicas de RVA suíno e humano foram identificados mais de 75 sítios de aminoácidos que diferenciam os rotavírus entre estas espécies, caracterizando as assinaturas genéticas (Figuras 7A e 7B).

Figura 6 – Árvore filogenéticas construídas com o critério de *maximum likelihood* para os genes VP6-VP1-VP2 (A), VP3-NSP1-NSP2 (B) e NSP3-NSP4-NSP5 (C), exceto para os genes VP4 e VP7. Utilizou-se mais de 1800 seqüências de RVA suíno e humano com > de 500 pb cada uma. O grupo DS-1 foi utilizado como *outgroup*. Os valores de *bootstrap* são mostrados em porcentagens. Os principais agrupamentos são representados por triângulos colorido em verde (amostras de origem humana), azul escuro (amostras de origem suína) azul claro (amostras consideradas atípicas de origem suína ou humana)

(C)

Figura 7 – Representações esquemáticas lineares das proteínas codificantes VP6-VP1-VP2-VP3 (A) e NSP1-NSP2-NSP3 (B) e os resíduos que distinguem RVA suíno e humano. Em vermelho são indicados os sítios que diferenciaram absolutamente entre os RVA destas duas espécies. Em amarelo são indicadas as posições que covariaram intermolecularmente com pelo menos uma proteína

(A)

(B)

Os resultados das análises de covariação através do software MISTIC mostrou uma extensiva rede de covariância entre as 7 proteínas estudadas. Cada proteína viral mostrou conexões intermoleculares com no mínimo uma outra proteína e inclusive com àqueles sítios destacados como assinaturas genéticas (Figuras 7A e 7B). Em média, todas as proteínas analisadas em relação a redes de covariância exibiram alto número de resíduos de mudanças de aminoácidos, sendo que o mais alto número de covariações intermoleculares foi encontrado na proteína VP6 (Figura 7A e Figura 8). Mais especificamente, 19 sítos de VP6 covariaram com posições de aminoácidos das outras proteínas analisadas. Do total de 128 conexões intermoleculares, 42 (maior número) ocorreram com a proteína VP2 (Figura 8).

Figura 8 – Conexões por pares de proteínas. Matriz mostrando o número de conexões intermoleculares de cada par de proteínas com ponto de corte ≥ 30

	VP6	VP1	VP2	VP3	NSP1	NSP2	NSP3
VP6		20	42	23	6	3	34
VP1			8	10	20	2	7
VP2				7	22	4	32
VP3					1	2	1
NSP1						5	31
NSP2							2
NSP3							

Figura 9— Árvore filogenética construída com o critério de *maximum likelihood* baseado na sequência parcial da ORF do gene codificante VP7. Legenda: As amostras suínas analisadas neste estudo estão marcadas com um triângulo. A escala representa o número de substituições/ sítio. Os valores de *bootstrap* (100 repetições) acima de 70% são mostrados nos nós correspondentes. A cepa RVA/Pigeon-tc/JPN/PO-13/1983/G18P[17] foi usada como *outgroup*

Fonte: (SILVA, F.D.F., 2015)

Figura 10 – Árvore filogenética construída com o critério de *maximum likelihood* baseado na sequência parcial da ORF do gene codificante VP4. Legenda: As amostras suínas analisadas neste estudo estão marcadas com um triângulo. A escala representa o número de substituições/ sítio. Os valores de *bootstrap* (100 repetições) acima de 70% são mostrados nos nós correspondentes. A cepa RVA/Pigeon-tc/JPN/PO-13/1983/G18P[17] foi usada como *outgroup*

Fonte: (SILVA, F.D.F., 2015)

Figura 11 – Árvore filogenética construída com o critério de *maximum likelihood* baseado na sequência completa da ORF do gene codificante VP6. Legenda: As amostras suínas analisadas neste estudo estão marcadas com um triângulo. A escala representa o número de substituições/sítio. Os valores de *bootstrap* (100 repetições) acima de 70% são mostrados nos nós correspondentes. A cepa RVA/Pigeon-tc/JPN/PO-13/1983/G18P[17] foi usada como *outgroup*

Fonte: (SILVA, F.D.F., 2015)

Figura 12 – Árvore filogenética construída com o critério de *maximum likelihood* baseado na sequência parcial da ORF do gene codificante VP1. Legenda: As amostras suínas analisadas neste estudo estão marcadas com um triângulo. A escala representa o número de substituições/ sítio. Os valores de *bootstrap* (100 repetições) acima de 70% são mostrados nos nós correspondentes. A cepa RVA/Pigeon-tc/JPN/PO-13/1983/G18P[17] foi usada como *outgroup*
 Fonte: (SILVA, F.D.F., 2015)

Figura 13 – Árvore filogenética construída com o critério de *maximum likelihood* baseado na sequência parcial da ORF do gene codificante VP2. Legenda: As amostras suínas analisadas neste estudo estão marcadas com um triângulo. A escala representa o número de substituições/ sítio. Os valores de *bootstrap* (100 repetições) acima de 70% são mostrados nos nós correspondentes. A cepa RVA/Pigeon-tc/JPN/PO-13/1983/G18P[17] foi usada como *outgroup*
 Fonte: (SILVA, F.D.F., 2015)

Figura 14 – Árvore filogenética construída com o critério de *maximum likelihood* baseado na sequência parcial da ORF do gene codificante VP3. Legenda: As amostras suínas analisadas neste estudo estão marcadas com um triângulo. A escala representa o número de substituições/ sítio. Os valores de *bootstrap* (100 repetições) acima de 70% são mostrados nos nós correspondentes. A cepa RVA/Pigeon-tc/JPN/PO-13/1983/G18P[17] foi usada como *outgroup*
 Fonte: (SILVA, F.D.F., 2015)

Figura 15 – Árvore filogenética construída com o critério de *maximum likelihood* baseado na sequência parcial da ORF do gene codificante NSP1. Legenda: As amostras suínas analisadas neste estudo estão marcadas com um triângulo. A escala representa o número de substituições/ sítio. Os valores de *bootstrap* (100 repetições) acima de 70% são mostrados nos nós correspondentes. A cepa RVA/Pigeon-tc/JPN/PO-13/1983/G18P[17] foi usada como *outgroup*
 Fonte: (SILVA, F.D.F., 2015)

Figura 16 – Árvore filogenética construída com o critério de *maximum likelihood* baseado na sequência completa da ORF do gene codificante NSP2. Legenda: As amostras suínas analisadas neste estudo estão marcadas com um triângulo. A escala representa o número de substituições/ sítio. Os valores de *bootstrap* (100 repetições) acima de 70% são mostrados nos nós correspondentes. A cepa RVA/Pigeon-tc/JPN/PO-13/1983/G18P[17] foi usada como *outgroup*

Fonte: (SILVA, F.D.F., 2015)

Figura 17 – Árvore filogenética construída com o critério de *maximum likelihood* baseado na sequência completa da ORF do gene codificante NSP3. Legenda: As amostras suínas analisadas neste estudo estão marcadas com um triângulo. A escala representa o número de substituições/ sítio. Os valores de *bootstrap* (100 repetições) acima de 70% são mostrados nos nós correspondentes. A cepa RVA/Pigeon-tc/JPN/PO-13/1983/G18P[17] foi usada como *outgroup*

Fonte: (SILVA, F.D.F., 2015)

Figura 18 – Árvore filogenética construída com o critério de *maximum likelihood* baseado na sequência completa da ORF do gene codificante NSP4. Legenda: As amostras suínas analisadas neste estudo estão marcadas com um triângulo. A escala representa o número de substituições/ sítio. Os valores de *bootstrap* (100 repetições) acima de 70% são mostrados nos nós correspondentes. A cepa RVA/Pigeon-tc/JPN/PO-13/1983/G18P[17] foi usada como *outgroup*

Fonte: (SILVA, F.D.F., 2015)

Figura 19 – Árvore filogenética construída com o critério de *maximum likelihood* baseado na sequência parcial da ORF do gene codificante NSP5. Legenda: As amostras suínas analisadas neste estudo estão marcadas com um triângulo. A escala representa o número de substituições/ sítio. Os valores de *bootstrap* (100 repetições) acima de 70% são mostrados nos nós correspondentes. A cepa RVA/Pigeon-tc/JPN/PO-13/1983/G18P[17] foi usada como *outgroup*
 Fonte: (SILVA, F.D.F., 2015)

6 DISCUSSÃO

O RVA é um dos agentes virais mais frequentemente identificados nas diarreias neonatais em suínos em todo o mundo (PAPP et al., 2013), além de serem relatados em várias granjas suinícolas no Brasil. Uma vez que são considerados um grande reservatório para RVA em humanos (MUKHERJEE et al., 2009; GHOSH et al., 2012b; ZELLER et al., 2012), a análise das sequências de todos os segmentos genômicos deste agente em suínos permite um melhor entendimento de sua diversidade, virulência, replicação e fornece novas perspectivas dentro dos mecanismos de evolução viral (MATTHIJNSSENS et al., 2008a).

Considerando que o genoma dos rotavírus possuem 11 segmentos de RNA e que todos são vulneráveis aos eventos de recombinação, a análise apenas dos genotipos G e P pode não ser suficiente na obtenção de dados conclusivos de toda a diversidade genética, ou da verdadeira origem das estirpes (GHOSH; KOBAYASHI, 2011). Até o momento, eram inexistentes análises dos 11 segmentos do genoma de RVA suíno e consequentemente informações mais assertivas sobre a diversidade genética e potencial zoonótico deste agente viral no país.

Os dados disponíveis na literatura sobre RVA analisados relatam principalmente a detecção das combinações genotípicas G5P[6], G5P[7], G6P[6], G10P[1], G9P[23], G9P[13]/P[22] e G3P[13]/P[22] (RÁCZ et al., 2000; BARREIROS et al., 2003; GREGORI et al., 2009 e TONIELTI et al., 2013b), assim como tem sido descritos esporadicamente os genotipos G4P[6] e G5P[23] (LORENZETTI et al., 2011, 2014; TONIELTI et al., 2013b). Neste estudo, através da análise de todos os 11 segmentos genômicos de 12 amostras de RVA suíno de 4 fazendas brasileiras detectou-se os genotipos G3, G5, G9 e G11, associados com P[6], P[13] e P[23] e uma constelação genotípica interna de I5-R1-C1-M1-A8-N1-T1/T7-E1-H1 (Quadro 6). A maioria das amostras sequenciadas neste estudo exibiu o genotipo G9P[23], uma combinação que tem sido cada vez mais relatada nas populações suínas do Brasil e de outros países (OKITSU et al., 2013; TONIELTI et al., 2013b; THEUNS et al., 2015).

Em relação ao gene codificante VP7, os genotipos G compartilhados entre as amostras de RVA de humanos e suínos apresentaram alta diversidade genética (Figura 9). Os genotipos G3 e G5 das amostras deste estudo foram mais

relacionados com outras de origem suína e agruparam-se distantemente das amostras de origem humana, com exceção da cepa RVA/Pig/wt/BRA/ROTA17/2013/G5P[6], que foi mais proximamente relacionada com a amostra RVA/Human-tc/BRA/IAL28/1992/G5P[8]. Em estudos anteriores, da Silva et al. (2011a,b) sugere que a alta frequência de detecção de amostras humanas com genotipo G5 no Brasil pode estar relacionado com as amostras de origem suína e humana que sofreram eventos de recombinação devido a infecções mistas. Resultados similares foram também descritos recentemente por Theuns et al. (2015) que demonstraram uma relação filogenética entre os genes de amostras suínas e humanas nos diferentes *subclusters* da árvore.

No presente estudo, a maior similaridade entre o gene codificante VP7 das amostras de RVA suíno e humano foi demonstrado no genotipo G9. As 5 amostras suínas pertencentes a este genotipo tiveram maior similaridade com a cepa RVA/Human-wt/IND/RMC321/1990/G9P[19], a qual possui características de RVA suíno em 7 dos 8 genes sequenciados (VARGHESE et al., 2006). De fato, Theuns et al. (2015) descreveram que o gene codificante VP7 das amostras suínas e humanas contemporâneas de genotipo G9 parecem ser mais relacionadas entre si do que quando comparadas com aquelas de outros genotipos de VP7. O baixo número de mutações apresentado entre as regiões antigênicas das sequências de genotipo G9 de humano e suíno reforçam estes resultados (THEUNS et al., 2015).

Rotavírus do grupo A classificados como genotipo G9 são comuns em humanos (MATTHIJNSSENS et al., 2010b) e os suínos são considerados um potencial reservatório também para este genotipo específico (MATTHIJNSSENS et al., 2010a; SMITH et al., 2011; PAPP et al., 2013). Embora existam dados que sugiram que a transmissão interespécie de RVA entre humano e suíno possa ocorrer, a origem dos genotipos G9 é ainda incerta e um aumento do número de estudos em animais, especialmente em suínos é crucial para responder esta questão (MATTHIJNSSENS et al., 2010a). De uma forma geral, as análises de amostras de RVA suíno demonstram maior nível de diversidade genética quando comparadas com as amostras de RVA isolados de humanos (MATTHIJNSSENS et al., 2010a,b).

Neste estudo, também foi detectado o genotipo G11, amostra RVA/Pig/wt/BRA/ROTA06/2013/G11P[6], a qual formou *clusters* com outras cepas de suíno e humano. Este genotipo tem sido relatado esporadicamente em várias

regiões geográficas e acredita-se ter origem suína (MATTHIJNSSENS, et al., 2010a). A descrição de eventos de recombinação em RVA de genotipo G11 entre amostras suínas e humanas é recente em outros países (SHETTY; MATHUR; DESHPANDE, 2014; THAN et al., 2013). No Brasil, este genotipo foi identificado em RVA isolado de vacas (SILVA et al., 2012), sugerindo a ocorrência de infecção cruzada do vírus devido a proximidade entre as criações de gado e suínos.

A análise filogenética do gene codificante VP4 das amostras de RVA suíno sequenciados neste estudo demonstrou que 4 cepas de genotipo P[6] foram mais proximamente relacionadas com as amostras RVA/Pig-t/BRA/PGRV29/2011/GXP[6] e RVA/Human-wt/ARG/Arg4605/2006/G4P[6] (Figura 10). Esta cepa caracterizada na Argentina apresentou a constelação genotípica *Wa-like* e foi relatado ser mais geneticamente similar com amostras de RVA suíno do que com RVA descrito em humanos (DEGIUSEPPE et al., 2013). Como mostrado na árvore filogenética do gene codificante VP4 (Figura 10), as amostras suínas P[6] deste estudo formaram *clusters* com outras amostras brasileiras as quais foi sugerido ser resultado de eventos de transmissão interespecie entre suínos e humanos. Reforçando estes resultados, as análises de rotavírus em suíno de diferentes áreas geográficas do sul da Europa, Espanha e Itália identificaram amostras de genotipo P[6] que possuíam o gene VP4 semelhante ao genotipo P[6] em humano (MARTELLA et al., 2006).

O genotipo P[23] foi o tipo mais comum detectado neste estudo (n=5/12) (Quadro 6) e todas estas amostras que pertenciam ao mesmo rebanho foram altamente relacionadas entre si. Recentemente, este genotipo foi caracterizado no Brasil (TONIETTI et al., 2013b), enquanto que na Europa e outros continentes foi descrito esporadicamente (PAPP et al., 2013). Em relação ao genotipo P[13] também caracterizado neste estudo, as amostras apresentaram o mais alto nível de diversidade entre si e revelaram o mais alto grau de identidade nucleotídica com outras cepas brasileiras isoladas em 2012 (TONIETTI et al., 2013b).

Neste estudo, 5 amostras foram caracterizadas como genotipo G9P[23], 2 G5P[13], 2 G5P[6], 1 G11P[6], 1 G3P[6] e 1 G3P[13] (Quadro 6). Este é o primeiro relato das combinações genotípicas G11P[6] e G3P[6] no Brasil de RVA em suínos. Sobre estas combinações, é importante destacar que na amostra de genotipo G11P[6] deste estudo, a maioria dos genes foram mais proximamente relacionadas com outros de RVA suíno e com amostras recombinantes humano-suíno ou bovino-suíno (BÁNYAI et al., 2009). Além disso, amostras de genotipo G3P[6] foram

caracterizadas recentemente em humanos nos estados do Amazonas e no Acre (DA SILVA SOARES et al., 2014). E na América Latina, esta combinação genotípica foi detectada na frequência de 0,2% em humanos com infecções por RVA (LINHARES et al., 2011), o que permite considerar a combinação G3P[6] raramente caracterizada em humanos e nunca antes descrita em suínos de granjas brasileiras.

A alta diversidade genética observada para os genes codificantes VP7 e VP4 neste estudo, constitui-se como um grande desafio para o desenvolvimento de medidas preventivas contra infecções de RVA em suínos. No Brasil, existem relatos da ocorrência de diarreias causadas por RVA em animais que são regularmente vacinados (BARREIROS et al., 2004; LORENZETTI et al., 2011). Segundo Matthijnssens et al. (2009), é possível que cepas de escape-vacinal possa ser gerada através da pressão do sistema imune decorrente de vacinação em massa, levando à emergência destes novos genótipos e aumentando a variabilidade.

As cepas de rotavírus do grupo A mais amplamente difundidas no mundo exibem a constelação genotípica *Wa-like* e compartilham a maioria, se não todos, dos genótipos das amostras de RVA suíno para os genes codificantes VP1-VP2-VP3-NSP2-NSP3-NSP4 e NSP5/6 (R1, C1, M1, N1, T1, E1 e H1, respectivamente) (MATTHIJNSSENS et al., 2008a). Dentro dos genes codificantes VP7, VP4 e VP6, as cepas de rotavírus humano *Wa-like* são encontradas mais comumente com os genótipos G1, G3, G4 ou G9, P[8] e I1 (MATTHIJNSSENS et al., 2008b). As análises filogenéticas das amostras de RVA do presente estudo mostrou que a matriz genética foi relativamente conservada, apesar diversidade encontrada nos genes codificantes VP7 e VP4. Além disso, esta matriz com a constelação genotípica I5-R1-C1-M1-A8-N1-T1/T7-E1-H1 se mostrou similar aos genogrupos caracterizados em RVA suíno e em amostras de RVA *porcine-like human* de outras diferentes regiões geográficas (Quadro 6). Notadamente, nenhuma das amostras caracterizadas neste estudo mostrou genes similares com aqueles de outras constelações genotípicas de RVA em humanos (DS-like). Ainda, de acordo com Theuns et al. (2015), esta conservada matriz genética pode ser essencial para a eficiência da replicação viral do RVA nos enterócitos de suínos.

A análise filogenética dos genes codificantes VP1, VP2 e VP3 mostrou que todas as 12 amostras caracterizadas neste estudo foram assinaladas como pertencentes ao genótipo 1 (R1, C1 e M1, respectivamente) (Figuras 12, 13 e 14). A caracterização molecular destes genes em rotavírus suíno do grupo A foi realizada

pela primeira vez mostrando que apesar de existirem múltiplas linhagens dentro do genotipo 1 dos genes correspondentes, as amostras de RVA em suínos e humanos puderam ser caracterizados em *sub-clusters* tipicamente suíno ou humano.

Em relação às características genéticas de amostras de rotavírus do grupo A circulante em diversas localidades do Brasil e de outros países, principalmente quanto às proteínas não estruturais, observa-se que a maior parte dos trabalhos presentes na literatura refere-se às amostras humanas. Ressalta-se assim, que na maioria deles há uma convergência quanto à necessidade do estudo concomitante dos rotavírus animais, de modo a proverem um melhor entendimento da sua ecologia (KHAMRIN et al., 2009), assim como dos mecanismos de evolução e transmissão interespecies. No que se refere à caracterização molecular das proteínas NSP1 e NSP3, não havia nenhum estudo em rotavírus suíno do grupo A no Brasil e as primeiras sequências caracterizadas foram descritas por Silva et al. (2015), como resultado desta pesquisa.

Assim, 7 das 12 amostras apresentaram o genotipo T7 para o gene codificante NSP3 (Figura 17; Quadro 6). Anteriormente, havia dificuldades em se inferir a origem evolucionária do genotipo T7 devido ao limitado número de sequências e o fato de que elas precisam estar inseridas nas complexas constelações genotípicas. Atualmente, o genotipo T7 do gene NSP3 tem sido cada vez mais descrito em suínos (PAPP et al., 2013; MONINI et al., 2014; THEUNS et al., 2015), mas, com mais frequência em amostras atípicas de suínos derivadas de humano G4P[6] (MAESTRI et al., 2012) e em amostras G9P[6] (ZELLER et al., 2012). Estes resultados confirmam a hipótese de que é mais provável que o genotipo T7 seja de origem suína do que tipicamente de RVA humano, assim como foi proposto por prévios autores (MARTEL-PARADIS et al., 2013; OKITSU et al., 2013; MONINI et al., 2014; THEUNS et al., 2015). Ainda, este estudo mostra a presença do genotipo T7 do gene codificante NSP3 de RVA pela primeira vez no Brasil, em diferentes granjas de suínos do estado de São Paulo e Mato Grosso.

Apesar dos RVA serem diferenciados de outros grupos essencialmente pelas características da VP6 e a detecção molecular desta proteína constituir um frequente alvo dos testes de diagnóstico para avaliar a presença deste grupo nas amostras (ZHU et al., 2013), não havia até o momento nenhum estudo no Brasil caracterizando o gene VP6 do grupo A de rotavírus em suínos. O gene codificante VP6 das amostras de RVA de origem suína analisadas neste estudo foram

caracterizados como genótipo I5, observando-se diversidade intragenotípica (Figura 11). As amostras de rotavírus deste estudo foram divididas em 2 sub-clados dentro do mesmo genótipo I5 e foram mais geneticamente relacionados com a cepa RVA/Human-tc/THA/Mc323/1989/G9P[19], a qual foi descrita como de matriz genética suína (GHOSH et al., 2012b). A proteína VP6 é considerada uma das mais imunogênicas do RVA (AIYEBO et al., 2013), além de ser bem estabelecido que o acúmulo de pontos de mutação no gene VP6 pode conduzir à mudanças de aminoácidos na proteína, resultando em variabilidade antigênica (THONGPRACHUM et al., 2009).

Os genes do RVA considerados os mais conservados são os codificantes NSP2, NSP4 e NSP5 (DONKER; KIRKWOOD, 2012; THEUNS et al., 2015). De fato, as análises filogenéticas dos genes codificantes destas proteínas das amostras de RVA suíno neste estudo demonstrou baixo nível de diversidade genética dentro dos genótipos N1, E1 e H1, respectivamente (Figuras 16, 18 e 19). Ao contrário, os genes codificantes VP7, VP4, VP3 e NSP1 (Figuras 9, 10, 14 e 15) formaram *clusters* com a maioria das amostras brasileiras de rotavírus suíno, mostrando que foram mais proximamente relacionados com os genes de amostras *porcine-RVA-like human* e cepas de origem humana da América do sul (MAESTRI et al., 2012; DEGIUSEPPE et al., 2013). Estes resultados são importantes uma vez que a relação evolucionária entre RVA suíno e humano pôde ser confirmada (THEUNS et al., 2015).

Neste estudo, mediante as inferências filogenéticas realizadas na primeira parte desta pesquisa constatou-se que apesar da predominância de uma matriz genética suína, algumas cepas de RVA deste estudo apresentaram maior similaridade nucleotídica com amostras humanas consideradas “típicas” e com aquelas de origem humana caracterizadas como produtos de transmissão interespecie. Estes resultados preliminares levantaram questões sobre o quão similares são os genes e proteínas de RVA que acometem suínos e humanos. Ainda, quais os resíduos de aminoácidos que podem distinguir os RVA suíno e humano e assim serem caracterizados como assinaturas genéticas em cada uma das espécies.

Para isso, foram realizadas novas inferências filogenéticas englobando amostras de origem suína e humanas adicionais pertencentes ao genótipo 1 (*Wa-like*) disponíveis no *Genbank*. Os resultados mostraram que as cepas de RVA suíno

agruparam-se separadamente daquelas de RVA em humanos pertencentes ao grupo 1 (*Wa-like*), mesmo quando compartilhando os mesmos genótipos (R1, C1, M1, N1 e H1) (Figuras 6A, 6B e 6C). Estes resultados sugerem que genes de amostras suínas e humanas podem se manter dentro de um hospedeiro-específico em nível de genótipos e subgenótipos devido à algumas proteínas codificantes atuarem melhor quando permanecem juntas. Esta coadaptação das proteínas virais podem influenciar o processo replicativo dos rotavírus e a evolução por recombinação gênica (ZHANG et al., 2014).

Para esta hipótese buscou-se identificar os aminoácidos relacionados com a adaptação dos rotavírus no hospedeiro assim como assinaturas genéticas que distinguíssem RVA suíno e humano. A abordagem baseada na busca de covariações foi utilizada (MISTIC) para quantificar os níveis de interdependência entre todas as possíveis posições dos alinhamentos concatenados de aminoácidos. Os resultados mostraram que mudanças detectadas em aminoácidos de uma proteína viral correlacionaram com mudanças em uma diferente proteína (Figura 8), caracterizando a covariação intermolecular (CODONER; FARES, 2008; DONLIN et al., 2012). Alguns destes resíduos que covariaram correspondem aos aminoácidos que foram definidos como assinaturas genéticas de cada espécie, sugerindo que os resíduos estão funcionalmente ligados (Figuras 7A e 7B). As covariações intermoleculares de aminoácidos têm sido descritas para outros vírus e é indicativo de coadaptação funcional e ou física da proteína (ROLLAND et al., 2010; STOBART et al., 2012).

A principal razão para a interdependência entre sítios de aminoácidos é que a função da proteína depende da sua estrutura tridimensional (3D) que se baseia nas complexas redes de interações funcionais e estruturais. A identificação de sítios de aminoácidos que se relacionam estruturalmente e/ou funcionalmente em uma proteína poderia lançar uma luz sobre a complexa dinâmica mutacional que ocorre durante a evolução das proteínas. Resíduos de aminoácidos funcionalmente relacionados são fortemente ligados evolutivamente porque as mutações em uma posição podem muito provavelmente ter efeitos nas posições dos aminoácidos dependentes (CODONER; FARES, 2008).

O maior número de covariações intermoleculares foi encontrado na proteína VP6 (Figura 7A e Figura 8) e do total de 128 conexões intermoleculares, 42 (maior número) ocorreram com a proteína VP2 (Figura 8). A proteína VP6 tem uma função

na organização da partícula vírica, estando em contato direto com ambas as camadas internas e externas do vírion, agindo como um adaptador físico entre as duas importantes funções biológicas de entrada na célula (camada externa) e empacotamento do RNA genômico viral (camada interna) (PRASAD; ESTES, 1997).

A análise da covariação entre VP6 e VP2 foi escolhida como demonstração-base por ser conhecida as suas interações e a função em definir a correta geometria da partícula viral, atuando indiretamente no ciclo de replicação do rotavírus (MATHIEU et al., 2001).

Sabe-se que pelo menos para amostras humanas, os resíduos de aminoácidos de VP1, VP2, VP3, VP6 e NSP2 covariam amplamente entre si. Em contraste, NSP1 e NSP3 não são conhecidos por interagir com outras proteínas virais e assim, não é esperado que seja mostrado redes intermoleculares de covariância de aminoácidos nesta espécie (ESTES; KAPIKIAN, 2007). No entanto, neste estudo foi mostrado rede de covariância de aminoácidos para todos os 7 genes (VP6, VP1, VP2, VP3, NSP1, NSP2, NSP3) de RVA em suínos pesquisados. É possível que as proteínas dos rotavírus suínos passem pelo processo de coadaptação de uma forma que não seja reflexo de suas interações proteína-proteína, mas sim, de seus efeitos sinérgicos na adaptação viral. Ainda assim, as análises de bioinformática são importantes porque estimularão novas hipóteses testáveis sobre as funções e interações das proteínas dos rotavírus, especificamente em suínos.

Os resultados deste estudo fazem surgir novas questões sobre a relação evolucionária entre RVA de suínos e humanos e a função da coadaptação das proteínas na manutenção de constelações genotípicas. No futuro, as assinaturas genéticas aqui descritas juntamente com os sítios de aminoácidos que covariaram poderão ser manipulados para a criação de novos candidatos a vacinas para humanos e animais que tenham uma menor capacidade de recombinar naturalmente com as cepas circulantes.

7 CONCLUSÃO

Neste estudo, foram caracterizados os 11 segmentos de dsRNA de rotavírus codificadores das proteínas não estruturais (NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 e NSP6) e estruturais (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 e VP7) presentes em amostras fecais suínas positivas para rotavírus do grupo A. Apesar de predominar o genotipo 1 (*Wa-like*) nas amostras pesquisadas, caracterizando-as essencialmente de matriz genética suína, a análise genômica sugere a existência de uma variação intragenotípica no genoma do rotavírus do grupo A atualmente circulante na população suína dos estados de São Paulo e Mato Grosso.

As análises das mudanças específicas de aminoácidos mostraram que muito resíduos em cada uma das proteínas podem ser considerados assinaturas genéticas de cada espécie. Além do que houve uma ampla rede de covariação intermolecular indicando a ocorrência de coadaptação das proteínas.

REFERÊNCIAS

- AIYEGBO, M. S.; SAPPARAPU, G.; SPILLER, B. W.; ELI, I. M.; WILLIAMS, D. R.; KIM, R.; LEE, D. E.; LIU, T.; LI, S.; WOODS, V. L.; NANNEMANN, D. P.; MEILER, J.; STEWART, P. L.; CROWE, J. E. Human Rotavirus VP6-Specific Antibodies Mediate Intracellular Neutralization by Binding to a Quaternary Structure in the Transcriptional Pore. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, p. 12-14, 2013.
- ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A. F.; BEUTTEMULLER, E. A.; BRITO, B. G.de; MÉDICI, K. C. Aspectos epidemiológicos da rotavirose suína na região sudoeste do estado do Paraná, Brasil. **Semina: ciências agrárias**, v. 20, n. 1, p. 5-11, 1999.
- AOKI, S. T.; SETTEMBRE, E.; TRASK, S. D.; GREENBERG, H. B.; STEPHEN, C.; DORMITZER, P. R. Structure of rotavirus outer-layer protein VP7 bound with a neutralizing Fab. **Science**, v. 324, n. 5933, p. 1444-1447, 2009.
- ARNOLD, M. M.; PATTON, J. T. Diversity of interferon antagonist activities mediated by NSP1 proteins of different rotavirus strains. **Journal of Virology**, v. 85, p. 1970-1979, 2011.
- ASANO, K. M.; DE SOUZA, S. P.; DE BARROS, I. N.; AYRES, G. R.; SILVA, S. O. S.; RICHTZENHAIN, L. J.; BRANDÃO, P. E. Multiplex semi-nested RT-PCR with exogenous internal control for simultaneous detection of bovine coronavirus and group A rotavirus. **Journal of Virological Methods**, v. 169, n. 2, p. 375-379, 2010.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL (ABPA). **Vendas para o Leste Europeu impulsionam e exportações de carne suína crescem 4,4% em 2015**. São Paulo, 2015. Disponível em: <<http://abpa-br.com.br/noticia/vendas-para-o-leste-europeu-impulsionam-e-exportacoes-de-carne-sui-na-crescem-44-em-2015-1362>>. Acessado em: 14 out. 2015.
- ATTOUI, H.; MERTENS, P.P.C.; BECNEL, J.; BELAGANAHALLI, S.; BERGOIN, M.; BRUSSAARD, C. P.; CHAPPELL, J. D.; CIARLET, M.; DEL VAS, M. Family reoviridae. In: KING, A. M. Q.; ADAMS, M. J.; CARSTENS, E. B.; LEFKOWITZ, E. J. **Virus taxonomy ninth report of the international committee on taxonomy of viruses**. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2011.
- BADARACCO, A.; MATTHIJNSSENS, J.; ROMERO, S.; HEYLEN, E.; ZELLER, M.; GARAI COECHEA, L.; VAN RANST, M.; PARREÑO, V. Discovery and molecular characterization of a group A rotavirus strain detected in an Argentinean vicuña (Vicugna vicugna). **Veterinary Microbiology**, v. 161, n. 3-4, p. 247-254, 2013.
- BALL, J. M.; TIAN, P.; ZENG, C. Q-Y.; MORRIS, A. P.; ESTES, M. K. Age-dependent diarrhea induced by a rotaviral nonstructural glycoprotein. **Science**, v. 272, p. 101-104, 1996.

BÁNYAI, K.; ESONA, M. D.; KERIN, T. K.; HULL, J. J.; MIJATOVIC, S.; VÁSCONEZ, N.; TORRES, C.; DE FILIPPIS, A. M. B.; GENTSCH, J. R. Molecular characterization of a rare, human-porcine reassortant rotavirus strain, G11P[6], from Ecuador. **Archives of Virology**, v. 154, n. 11, p. 1823-1829, 2009.

BARBOSA, B. R. P.; BERNARDES, N. T. C. G.; BESERRA, L. A. R.; GREGORI, F. Molecular characterization of the porcine group A rotavirus NSP2 and NSP5/6 genes from São Paulo State, Brazil, in 2011/12. **The Scientific World Journal**, v. 2013, 7 pages, 2013.

BARREIROS, M. A. B.; ALFIERI, A. F.; MÉDICI, K. C.; LEITE, J. P. G.; ALFIERI, A. A. G and P genotypes of group A rotavirus from diarrhoeic calves born to cows vaccinated against the NCDV (P[1],G6) rotavirus strain. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 51, n. 3, p. 104-109, 2004.

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

BARRY, A. F.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Calicivirus animal. **Semina: ciências agrárias**, n. 29, p. 933-946, 2008.

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

BLUTT, S. E.; KIRKWOOD, C. D.; PARRENO, V. Rotavirus antigenaemia and viraemia: a common event? **Lancet**, v. 362, p. 1445-1449, 2003.

CAMARGO, D. S. de; MATOS, J. C. S. de; GUERRA, S. F. S.; SOARES, L. S.; OLIVEIRA, A. S. L. de; OLIVEIRA, D. S.; GABBAY, Y. B.; LINHARES, A. C.; MASCARENHAS, J. D. P. Identification of rotavirus G and P genotypes in nursing and weaned piglets in the metropolitan region of Belém, Pará State, Northern Brazil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 3, n. 3, p. 11-19, 2012.

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

CHANG, K.; KIM, Y.; SAIF L. J. Rotavirus and reovirus. In ZIMMERMAN, J. J.; KARRIKER, L. A.; RAMIREZ, A.; SCHWARTZ, K. J.; STEVENSON, G. W (Ed.). **Diseases of swine**. 10th ed. United Kingdom: Wiley-Blackwell, 2012. p. 621-634.

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.

CODONER, F. M.; FARES, M. A. Why should we care about molecular coevolution? **Evolutionary Bioinformatics**, v. 2008, n. 4, p. 237-246, 2008.

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

CONNER, M. E.; MATSON, D. O.; ESTES, M. K. Rotavirus vaccines and vaccination potential. In: RAMIG, R. F. **Current Topics in Microbiology and Immunology (Rotaviruses)**, v. 185, p. 285-337, 1994.

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

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

CRIGLAR, J. M.; HU, L.; CRAWFORD, S. E.; HYSER, J. M.; BROUGHMAN, J. R.; PRASAD, B. V. V.; ESTES, M. K. A Novel form of rotavirus NSP2 and phosphorylation-dependent NSP2-NSP5 interactions are associated with viroplasm assembly. **Journal of virology**, v. 88, n. 2, p. 786-98, 2014.

CUNHA, M. S. **Caracterização e análise molecular do gene codificador da nsp4 (proteína não estrutural 4) de rotavírus suínos**. 2011. [62 p.]. Dissertação (Mestrado em Sanidade Animal, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico, São Paulo, 2011.

DA SILVA, M. F. M.; TORT, L. F. L.; GOMEZ, M. M.; ASSIS, R. M. S.; VOLOTÃO, E. M.; MENDONÇA, M. C. L.; BELLO, G.; LEITE, J. P. G. VP7 gene of human rotavirus A genotype G5: Phylogenetic analysis reveals the existence of three different lineages worldwide. **Journal of Medical Virology**, v. 83, p. 357-366, 2011a.

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

DA SILVA SOARES, L.; DOS SANTOS GUERRA, S.F.; DE OLIVEIRA, A.S.; DOS SANTOS, F.S.; DE MENEZES, F.C.; MASCARENHAS, J.P.; LINHARES, A.C. Diversity of rotavirus strains circulating in northern Brazil after introduction of a rotavirus vaccine: high prevalence of G3P[6] genotype. **Journal of Medical Virology**, v. 86, p. 1065-107

DEGIUSEPPE, J. I.; BELTRAMINO, J. C.; MILLÁN, A.; STUPKA, J. A.; PARRA, G. I. Complete genome analyses of G4P[6] rotavirus detected in Argentinean children with diarrhoea provides evidence of interspecies transmission from swine. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 19, n. 8, p. 367-371, 2013.

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

DHIMAN, S. Comparison of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Immunochromatography for Rotavirus Detection in Children Below Five Years with Acute Gastroenteritis. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 9, p. 6-9, 2015.

DONKER, N. C.; KIRKWOOD, C. D. Selection and evolutionary analysis in the nonstructural protein NSP2 of rotavirus A. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, n. 7, p. 1355-1361, 2012.

DONLIN, M. J.; SZETO, B.; GOHARA, D. W.; AURORA, R.; TAVIS, J. E. Genome-Wide Networks of Amino Acid Covariances Are Common among Viruses. **Journal of Virology**, v. 86, p. 3050-3063, 2012.

ESTES, M. K. Rotaviruses and their replication. In: KNIPE, D. M. HOWLEY, P.M.; GRIFFIN, D.E.; LAMB, R.A.; MARTIN, M.A. ROIZMAN, B.; STRAUS, S.E. (ed). **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.; GRIFFIN, D.E.; LAMB, R.A.; MARTIN, M.A. ROIZMAN, B.; STRAUS, S.E. (ed). **Fields virology**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott, Williams and Wilkins, 2007, p. 1917-1974.

ESTES, M.; GREENBERG, H. B. Rotaviruses. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M.; COHEN, J. I.; GRIFFIN, D. E.; LAMB, R. A.; MARTIN, M. A.; ROIZMAN, B.; RACANIELLO, V. R. (Ed.). **Fields virology**. 6th ed. Pennsylvania; Philadelphia: Lippincott Williams; Wilkins, 2013. p. 1347-1401.

FARES, M. A. Computational and statistical methods to explore the various dimensions of protein evolution. **Current Bioinformatics**, v. 1, n. 2, p. 207-217, 2006.

FENAUX, M.; CUADRAS, M. A.; FENG, N.; JAIMES, M.; GREENBERG, H. B. Extraintestinal spread and replication of a homologous EC rotavirus strain and a heterologous rhesus rotavirus in BALB/c mice. **Journal of Virology**, v. 80, n. 11, p. 5219-5232, 2006.

FITCH, W. M. Rate of change of concomitantly variable codons. **Journal of Molecular Evolution**, v. 1, n. 1, p. 84-96, 1971.

FITCH, W. M.; MARKOWITZ, E. An improved method for determining codon variability in a gene and its application to the rate of fixation of mutations in evolution. **Biochemical Genetics**, v. 4, n. 5, p. 579-593, 1970.

FLEWETT, T. H.; BRYDEN, A. S.; DAVIES, H. Diagnostic electron microscopy of faeces. I- The viral flora of the faeces as seen by electron microscopy. **Journal of Clinical Pathology**, v. 27, p. 603-608, 1974.

FLEWETT, T. H.; BRYDEN, A. S.; DAVIES, H. Virus particles in gastroenteritis. **Lancet**, v. 2, p. 1497, 1973.

FLORES, E. F. Diagnóstico laboratorial das infecções víricas. In: _____. **Virologia veterinária**. 3. ed. Santa Maria: UFSM, 2007. p. 297-326.

FOURNIE, G.; KEARSLEY-FLEET, L.; OTTE, J.; PFEIFFER, D. **Trends in the emergence of swine pathogens**. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Regional office for Asia and the Pacific. Bangkok, Thailand, 2012. p. 1-36.

FRASER, H. B.; HIRSH, A. E.; WALL, D. P.; EISEN, M. B. Coevolution of gene expression among interacting proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 24, p. 9033-9038, 2004.

GATTI, M. S. V.; HARA, N. H.; FERRAZ, M. M. G.; CASTRO, A. F. P. D. Presence of Group a and Non-a Rotaviruses in Neonatal Piglets in Campinas, SP, Brazil. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 178, n. 6, p. 347-350, 1989.

GENTSCH, J. R.; GLASS, R. I.; WOODS, P.; GOUVEA, V.; GORZIGLIA, M.; FLORES, J.; DAS, B. K.; BHAN, M. K. Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 6, p. 1365-1373, 1992.

GHOSH, S.; KOBAYASHI, N. Whole-genomic analysis of rotavirus strains: current status and future prospects. **Future Microbiology**, v. 6, n. 9, p. 1049-1065, 2011.

GHOSH, S.; SHINTANI, T.; KOBAYASHI, N. Evidence for the porcine origin of equine rotavirus strain H-1. **Veterinary Microbiology**, v. 158, p.410-414, 2012a.

GHOSH, S.; URUSHIBARA, N.; TANIGUCHI, K.; KOBAYASHI, N. Whole genomic analysis reveals the porcine origin of human G9P[19] rotavirus strains Mc323 and Mc345. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, n. 2, p. 471-477, 2012b.

GHOSH, S.; VARGHESE, V.; SAMAJDAR, S.; BHATTACHARYA, S. K.; KOBAYASHI, N.; NAIK, T. N. Molecular characterization of a porcine Group A

rotavirus strain with G12 genotype specificity. **Archives of Virology**, v. 151, n. 7, p. 1329-1344, 2006.

GOBEL, U.; SANDER, C.; SCHNEIDER, R.; VALENCIA, A. Correlated mutations and residue contacts in proteins. **Proteins**, v. 18, n. 4, p. 309-317.

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

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

GREGORI, F.; BRANDAO, P. E.; JEREZ, J. A. Intragenotypic diversity of porcine rotavirus strains circulating in São Paulo State, Brazil. **ARS Veterinaria**, v. 28, n. 1, p. 28-35, 2012.

GREGORI, F.; ROSALES, C. A. R.; BRANDÃO, P. E.; SOARES, R. M.; JEREZ, J. A. Diversidade genotípica de rotavírus suínos no Estado de São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 9, p. 707-712, 2009.

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

GUNSON, R. N.; MILLER, J.; LEONARD, A.; CARMAN, W. F. Importance of PCR in the diagnosis and understanding of rotavirus illness in the community. **Communicable disease and public health**, v. 6, p. 63-65, 2003.

GUO, D.; LIU, J.; LU, Y.; SUN, Y.; YUAN, D.; JIANG, Q.; LIN, H.; LI, C.; SI, C.; QU, L. Full genomic analysis of rabbit rotavirus G3P[14] strain N5 in China: identification of a novel VP6 genotype. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, n. 7, p. 1567-1576, 2012.

HA, T. P.; KIM, H. J.; SAIF, L. J.; JEONG, Y. J.; KIM, H. H.; KWON, H. J.; PARK, S. J.; CHO, K. O. Sequence analysis of unusual P[7]G5 bovine rotavirus strains reveals evidence of interspecies transmission. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 10, p. 3329-3332, 2009.

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.

HEIMAN, E. M.; MCDONALD, 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.

HOLLOWAY, G.; JOHNSON, R. I.; KANG, Y.; DANG, V. T.; STOJANOVSKI, D.; COULSON, B. S. Rotavirus NSP6 localizes to mitochondria via a predicted n-terminal α -helix. **Journal of General Virology**, DOI: 10.1099/JGV.0.000294, 2015.

Disponível em:

<<http://jgv.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/jgv.0.000294>>.

Acesso em: 20 out. 2015.

HONDA, M.; BEARD, M. R.; PING, L. H.; LEMON, S. M. A phylogenetically conserved stem-loop structure at the 5' border of the internal ribosome entry site of hepatitis C virus is required for cap-independent viral translation. **Journal of virology**, v. 73, n. 2, p. 1165-1174, 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.

HUANG, Z.; WU, Y.; ROBERTSON, J.; FENG, L.; MALMBERG, R. L.; CAI, L. Fast and accurate search for non-coding RNA pseudoknot structures in genomes. **Bioinformatics**, v. 24, n. 20, p. 2281-7, 2008.

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

JEONG, Y.; PARK, S.; HOSMILLO, M.; SHIN, D.; CHUN, Y.; KIM, H.; KWON, H.; KANG, S.; WOO, S.; PARK, S.; KIM, G.; KANG, M.; CHO, K. Detection and molecular characterization of porcine group C rotaviruses in South Korea. **Veterinary Microbiology**, v. 138, n. 3-4, p. 217-224, 2009.

JERE, K. C.; ESONA, M. D.; ALI, Y. H.; PEENZE, I.; ROY, S.; BOWEN, M. D.; SAEED, I. K.; KHALAFALLA, A. I.; NYAGA, M. M.; MPHAHLELE, J.; STEELE, D.; SEHERI, M. L. Novel NSP1 genotype characterised in an African camel G8P[11] rotavirus strain. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 21, p. 58-66, 2014.

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

KATSUDA, K.; KOHMOTO, M.; KAWASHIMA, K.; TSUNEMITSU, H. Frequency of enteropathogen detection in suckling and weaned pigs with diarrhea in Japan. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 18, p.350-354, 2006.

- KAVANAGH, O. V.; AJAMIA, N. J.; CHENGA, E.; CIARLET, M.; ROBERTO, A.; GUERRERO, R. A.; ZENGA, C. Q. Y.; CRAWFORD, S. E.; ESTES, M. K. Rotavirus enterotoxin NSP4 has mucosal adjuvant properties. **Vaccine**, v. 28, p. 3106-3111, 2010.
- KEARSE, M.; MOIR, R.; WILSON, A.; STONES-HAVAS, S.; CHEUNG M.; STURROCK, S.; BUXTON, S.; COOPER, A.; MARKOWITZ, S.; DURAN, C.; THIERER, T. Geneious: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics**, n. 28, p. 1647-1649, 2012.
- KHARIM, P.; MANEEKARN, N.; PEERAKOME, S.; MALASAO, R.; THONGPRACHUM, A.; CHAN-IT, W.; MIZUGUCHI, M.; OKITSU, S.; USHJIMA, H. Molecular characterization of VP4, VP6, VP7, NSP4, and NSP5/6 genes identifies an unusual G3P[10] human rotavirus strain. **Journal of Medical Virology**, v. 81, p. 176-182, 2009.
- KIM, H. J.; PARK, J. G.; MATTHJUNSSSENS, J.; LEE, J.; BAE, Y.; ALFAJORO, M. M.; PARK, S.; KANG, M.; CHO, K. Intestinal and extra-intestinal pathogenicity of a bovine reassortant rotavirus in calves and piglets. **Veterinary Microbiology**, v. 152, n. 3-4, p. 291-303, 2011.
- KUMAR, M.; JAYARAM, H.; CARPIO, R. V.; JIANG, X.; TARAPOREWALA, Z. F.; JACOBSON, R. H.; PATTON, J. T.; PRASAD, B. V. Crystallographic and biochemical analysis of rotavirus NSP2 with nucleosides reveals an NDP kinase like activity. **Journal of Virology**, v. 81, p. 12272-12284, 2007.
- LACHAPELLE, V.; SOHAL, J. S.; LAMBERT, M. C.; BRASSARD, J.; FRAVALO, P.; LETELLIER, A.; L'HOMME, Y. Genetic diversity of group A rotavirus in swine in Canada. **Archives of Virology**, v. 159, n. 7, p. 1771-1779, 2014.
- LARKIN, M.A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N.P.; CHENNA, R.; MCGETTIGAN, P.A.; MCWILLIAM, H.; VALENTIN, F.; WALLACE, I.M.; WILM, A.; LOPEZ, R.; THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; HIGGINS, D.G. Clustal W and clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, v. 23, p. 2947-2948, 2007.
- LARSON, S. M.; DI NARDO, A. A.; DAVIDSON, A. R. Analysis of covariation in an SH3 domain sequence alignment: applications in tertiary contact prediction and the design of compensating hydrophobic core substitutions. **Journal of molecular biology**, v. 303, n. 3, p. 433-446, 2000.
- LEE, C. N.; WANG, Y. L.; KAO, C. L.; ZAO, C. L.; LEE, C. Y.; CHEN, H. N. NSP4 gene analysis of Rotavirus recovered from infected children with and without diarrhea. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 12, p. 4471-4477, 2000.

LIGHT, J. S.; HODES, H. L. Studies on epidemic diarrhea of the new-born: isolation of a filtrable agent causing diarrhea in calves. **American Journal of Public Health**, v. 33, n. 12, p. 1451-1454, 1943.

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

LINHARES, A. C.; PINHEIRO, F. P.; SCHMETZ, C.; MULLER, G.; PETERS, D. Duovírus (rotavírus) em Belém do Pará, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 19, p. 278-279, 1977.

LINHARES, A. C.; STUPKA, J. A.; CIAPPONI, A.; BARDACH, A. E.; GLUJOVSKY, D.; ARUJ, P. K.; MAZZONI, A.; RODRIGUEZ, J. A. B.; REARTE, A.; LANZIERI, T. M.; ORTEGA-BARRIA, E.; COLINDRES, R. Burden and typing of rotavirus group A in Latin America and the Caribbean: systematic review and meta-analysis. **Reviews in Medical Virology**, v. 21, p. 89-109, 2011.

LIPRANDI, F.; GERDER, M.; BASTIDAS, Z.; LOPEZ, J. A.; PUJOL, F. H.; LUDERT, J. E.; JOELSSON, D. B.; CIARLET, M. A novel type of VP4 carried by a porcine rotavirus strain. **Virology**, v. 315, n. 2, p. 373-380, 2003.

LOGAN, C.; O'LEARY, J. J.; O'SULLIVAN, N. Real-time reverse transcription-PCR for detection of rotavirus and adenovirus as causative agents of acute viral gastroenteritis in children. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 9, p. 3189-3195, 2006.

LORENZETTI, E.; DA SILVA MEDEIROS, T. N.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Genetic heterogeneity of wild-type G4P[6] porcine rotavirus strains detected in a diarrhea outbreak in a regularly vaccinated pig herd. **Veterinary Microbiology**, v. 154, n. 1-2, p. 191-196, 2011.

LORENZETTI, E.; STIPP, D. T.; POSSATTI, F.; CAMPANHA, J. E. T.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Diarrhea outbreaks in suckling piglets due to rotavirus group C single and mixed (rotavirus groups A and B) infections. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 5, p. 391-397, 2014.

LU, X.; MCDONALD, S. M.; TORTORICI, M. A.; TAO, Y. J.; CARPIO, V.; NIBERT, M. L.; PATTON, J. T.; HARRISON, S. C. Mechanism for coordinated RNA packaging and genome replication by rotavirus polymerase VP1. **NIH Public Access**, v. 16, n. 11, p. 1678-1688, 2008.

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.

MAESTRI, R. P.; KAIANO, J. H.; NERI, D. L.; SOARES, L. S.; GUERRA, S. F.; OLIVEIRA, D. S.; FARIAS, Y. N.; GABBAY, Y. B.; LEITE, J. P.; LINHARES, A. C.; MASCARENHAS, J. D. Phylogenetic analysis of probable non-human genes of group A rotaviruses isolated from children with acute gastroenteritis in Belém, Brazil. **Journal of Medical Virology**, v. 84, p. 1993-2002, 2012.

MARCONI, E. C. M.; BERNARDES, N. T. C. G.; BESERRA, L. A. R.; SILVA, F. D. F.; GREGORI, F. Development of a Real-time PCR test for porcine group A rotavirus diagnosis. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, n. 1, p. 39-43, 2015.

MARTELLA, V.; BÁNYAI, K.; CIARLET, M.; ITURRIZA-GÓMARA, M.; LORUSSO, E.; DE GRAZIA, S.; ARISTA, S.; DECARO, N.; ELIA, G.; CAVALLI, A.; CORRENTE, M.; LAVAZZA, A.; BASELGA, R.; BUONAVOGLIA, C. Relationships among porcine and human P[6] rotaviruses: Evidence that the different human P[6] lineages have originated from multiple interspecies transmission events. **Virology**, v. 344, n. 2, p. 509-519, 2006.

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

MARTEL-PARADIS, O.; LAURIN, M. A.; MARTELLA, V.; SOHAL, J. S.; L'HOMME, Y. Full-length genome analysis of G2, G9 and G11 porcine group A rotaviruses. **Veterinary Microbiology**, v. 162, n. 1, p. 94-102, 2013.

MARTHALER, D.; ROSSOW, K.; GRAMER, M.; COLLINS, J.; GOYAL, S.; TSUNEMITSU, H.; KUGA, K.; SUZUKI, T.; CIARLET, M.; MATTHIJNSSENS, J. Detection of substantial porcine group B rotavirus genetic diversity in the United States, resulting in a modified classification proposal for G genotypes. **Virology**, v. 433, n. 1, p. 85-96, 2012.

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

MARTÍNEZ-SALAS, E. The impact of RNA structure on picornavirus IRES activity. **Trends in Microbiology**, v. 16, n. 5, p. 230-237, 2008.

MATHIEU, M.; PETITPAS, I.; NAVAZA, J.; LEPAULT, J.; KOHLI, E.; POTHIER, P.; PRASAD VENKATARAM, B.; COHEN, J.; REY, F. Atomic structure of the major capsid protein of rotavirus: Implications for the architecture of the virion. **EMBO Journal**, v. 20, n. 7, p. 1485-1497, 2001.

MATTHEWS, R. E. F. The classification and nomenclature of viruses. Summary of results of meetings of the International Committee on Taxonomy of Viruses in The Hague. **Intervirology**, v.11, p. 133-135, 1979.

MATTHIJNSSENS, J.; BILCKE, J.; CIARLET, M.; MARTELLA, V.; BÁNYAI, K.; RAHMAN, M.; ZELLER, M.; BEUTELS, P.; VAN DAMME, P.; VAN RANST, M. Rotavirus disease and vaccination: impact on genotype diversity. **Future Microbiology**, v. 4, n. 10, p. 1303-1316, 2009.

MATTHIJNSSENS, J.; CIARLET, M.; HEIMAN, E.; ARJIS, I.; DELBEKE, T.; MCDONALD, S. M.; PALOMBO, E. A.; ITURRIZA-GÓMARA, M.; MAES, M.; PATTON, J. T.; RAHMAN, M.; VAN RANST, M. Full genome-based classification of rotaviruses reveals a common origin between human Wa-like and porcine rotavirus strains and human DS-1-like and bovine rotavirus strains. **Journal of Virology**, v. 82, n. 7, p. 3204-3219, 2008a.

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

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

MATTHIJNSSENS, J.; DESSELBERGER, U. Genome diversity and evolution of rotaviruses. In: Hacker, J., Dobrindt, U., Kurth, R. (Ed.). **Genome plasticity and infectious diseases**. Washington, D.C.: ASM Press, 2012. p. 219-241.

MATTHIJNSSENS, J.; HEYLEN, E.; ZELLER, M.; RAHMAN, M.; LEMEY, P.; VAN RANST, M. Phylodynamic Analyses of Rotavirus Genotypes G9 and G12 Underscore Their Potential for Swift Global Spread. **Molecular Biology and Evolution**, v. 27, n. 10, p. 2431-2436, 2010b.

MATTHIJNSSENS, J.; MARTELLA, V.; VAN RANST, M. Genomic evolution, host-species barrier, reassortment and classification of rotaviruses. **Future Virology**, v. 5, n. 4, p. 385-390, 2010.

MATTHIJNSSENS, J.; OTTO, P. H.; CIARLET, M.; DESSELBERGER, U.; VAN RANST, M.; JOHNE, R. VP6-sequence-based cutoff values as a criterion for rotavirus species demarcation. **Archives of Virology**, v. 157, n. 6, p. 1177-1182, 2012.

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, n. 4, p. 625-630, 2010a.

MCCLAIN, B.; SETTEMBRE, E.; TEMPLE, B. R. S.; BELLAMY, A. R.; HARRISON, S. C. X-ray Crystal Structure of the Rotavirus Inner Capsid Particle at 3.8 Å Resolution. **Journal of Molecular Biology**, v. 397, n. 2, p. 587-599, 2010.

MCDONALD, S. M.; MATTHIJNSSENS, J.; MCALLEN, J. K.; HINE, E.; OVERTON, L.; WANG, S.; LEMEY, P.; ZELLER, M.; VAN RANST, M.; SPIRO, D. J.; PATTON, J. T. Evolutionary Dynamics of Human Rotaviruses: Balancing Reassortment with Preferred Genome Constellations. **PLoS Pathogens**, v. 5, n.10, p. 1-14, 2009.

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.

MEBUS, C. A.; UNDERDAHL, N. R.; RHODES, M. B.; TWIEHAUS, M. J. Calf diarrhoea (scours) reproduced with a virus from a field outbreak. **Nebraska-Agricultural Experiment Station Research Bulletin**, n. 233, p.1-16, 1969.

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

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

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.

MORELLI, M.; OGDEN, K. M.; PATTON, J. T. Silencing the alarms: Innate immune antagonism by rotavirus NSP1 and VP3. **Virology**, v. 479-480, p. 75-84, 2015

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

NAKAGOMI, O.; NAKAGOMI, T.; AKATANI, K.; IKEGAMI, N. Identification of rotavirus genogroups by RNA-RNA hybridization. **Molecular and Cellular Probes**, v. 3, n. 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, n. 16, p. 9072-9085, 2014.

OKITSU, S.; KHAMRIN, P.; THONGPRACHUM A.; KONGKAEW, A.; ANEEKARN, N.; MIZUGUCHI, M.; HAYAKAWA, S.; USHIJIMA, H. Whole-genomic analysis of G3P[23], G9P[23] and G3P[13] rotavirus strains isolated from piglets with diarrhea in Thailand, 2006–2008. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 18, p. 74-86, 2013.

OLMEA, O.; ROST, B.; VALENCIA, A. Effective use of sequence correlation and conservation in fold recognition. **Journal of Molecular Biology**, v. 293, n. 5, p. 1221–39, 1999.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION (PAHO). Rotaviral gastroenteritis. In: _____. Zoonoses and communicable diseases common to man and animals. 3. ed. Washington: PAHO, 2001. v. 2, p. 286-294.

PAPP, H.; LÁSZLÓ, B.; JAKAB, F.; GANESH, B.; DE GRAZIA, S.; MATTHIJNSSENS, J.; CIARLET, M.; MARTELLA, V.; BÁNYAI, K. Review of group A rotavirus strains reported in swine and cattle. **Veterinary Microbiology**, v. 165, n. 3-4, p. 190-199, 2013.

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

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

PESAVENTO, J. B.; ESTES, M. K.; PRASAD, B. V. V. Structural organization of the genome in rotavirus. In: DESSELBERGER, U.; GRAY, J. (Ed.). **Viral gastroenteritis**. Amsterdam: Elsevier Science, 2003. v. 9, p. 115-128.

PHAN, T. G.; OKITSU, S.; MANEEKARN, N.; USHIJIMA, H. Evidence of Intragenic Recombination in G1 Rotavirus VP7 Genes. **Journal of Virology**, v. 81, n. 18, p. 10188-10194, 2007.

PRASAD, B. V. V.; ESTES, M. K. (ed.). **Molecular basis of rotavirus replication: structure-function correlations**. New York, NY: Oxford University Press, 1997.

RÁCZ, M. L.; KROEFF, S. S.; MUNFORD, V.; CARUZO, T. A. R.; DURIGON, E. L.; HAYASHI, Y.; GOUVEA, V.; PALOMBO, E. A. Molecular characterization of porcine rotaviruses from the southern region of Brazil: Characterization of an atypical

genotype G[9] strain. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 6, p. 2443-2446, 2000.

RAINSFORD, E. W.; MCCRAE, M. A. Characterization of the NSP6 protein product of rotavirus gene 11. **Virus Research**, v. 130, n. 1-2, p. 193-201, 2007.

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

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

RODGER, S. M.; CRAVEN, J. A.; WILLIAMS, I. Letter: Demonstration of reovirus-like particles in intestinal contents of piglets with diarrhoea. **Australian Veterinary Journal**, v. 51, n.11, p. 536, 1975.

RODRÍGUEZ, J. M.; CHICHÓN, F. J.; MARTÍN-FORERO, E.; GONZÁLEZ-CAMACHO, F.; CARRASCOSA, J. L.; CASTÓN, J. R.; LUQUE, D. New Insights into Rotavirus Entry Machinery: Stabilization of Rotavirus Spike Conformation Is Independent of Trypsin Cleavage. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 5, p. e1004157, 2014.

ROLLAND, M.; CARLSON, J. M.; MANOCHEEWA, S.; SWAIN, J. V.; LANXON-COOKSON, E.; DENG, W.; ROUSSEAU, C. M.; RAUGI, D. N.; LEARN, G. H.; MAUST, B. S.; COOVADIA, H.; NDUNG'U, T.; GOULDER, P. J. R.; WALKER, B. D.; BRANDER, C.; HECKERMAN, D. E.; MULLINS, J. I. Amino-acid co-variation in HIV-1 Gag subtype C: HLA-mediated selection pressure and compensatory dynamics. **PloS one**, v. 5, n. 9, p. 1-10, 2010.

RUGGERI, F. M.; GREENBERG, H. B. Antibodies to the trypsin cleavage peptide VP8 neutralize rotavirus by inhibiting binding of virions to target cells in culture. **Journal of Virology**, v. 65, n. 5, p. 2211-2219, 1991.

SALEM, A. N. B.; SERGEI, A. C.; OLGA, P. B.; OLGA, G. A.; MAHJOUR, A.; LARISSA, B. P. Multiplex nested RT-PCR for the detection of porcine enteric viruses. **Journal of Virological Methods**, v. 165, n. 2, p. 283-93, 2010.

SANTOS, N.; LIMA, R. C.; NOZAWA, C. M.; LINHARES, R. E.; GOUVEA, V. Detection of porcine rotavirus type G9 and of a mixture of types G1 and G5 associated with Wa-like VP4 specificity: evidence for natural human-porcine genetic reassortment. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 8, p. 2734-2736, 1999.

SANTOS, N.; VOLOTÃO, E. M.; SOARES, C. C.; ALBUQUERQUE, M. C. M.; DA SILVA, F. M.; CHIZHIKOV, V.; HOSHINO, Y. VP7 gene polymorphism of serotype G9 rotavirus strains and its impact on G genotype determination by PCR. **Virus Research**, v. 90, n. 1, p. 1-14, 2002.

SANTOS, N.; VOLOTÃO, E. M.; SOARES, C. C.; CAMPOS, G. S.; SARDI, S. I.; HOSHINO, Y. Predominance of rotavirus genotype G9 during the 1999, 2000, and 2002 seasons among hospitalized children in the city of Salvador, Bahia, Brazil: Implications for future vaccine strategies. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 8, p. 4064-4069, 2005.

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

SETTEMBRE, E. C.; CHEN, J. Z.; DORMITZER, P. R.; GRIGORIEFF, N.; HARRISON, S. C. Atomic model of an infectious rotavirus particle. **The EMBO Journal**, v. 30, n. 2, p. 408-416, 2011.

SHEN, S.; BURKE, B.; DESSELBERGER, U. Rearrangement of the VP6 gene of a group A rotavirus in combination with a point mutation affecting trimer stability. **Journal of Virology**, v. 68, p. 1682-1688, 1994.

SHETTY, S. A.; MATHUR, M.; DESHPANDE, J. M. Complete genome analysis of a rare group A rotavirus, G11P[25], isolated from a child in Mumbai, India, reveals interspecies transmission and reassortment with human rotavirus strains. **Journal of Medical Microbiology**, v. 63, n. 9, p. 1220-1227, 2014.

SILVA, F. D. F.; ESPINOZA, L. R. L.; TONIETTI, P. O.; BARBOSA, B. R. P.; 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.

SILVA, F. D. F.; GREGORI, F.; GONÇALVES, A. C. S.; MARA, S. I. S.; BUZINARO, M. G. Molecular characterization of group a bovine rotavirus in Southeastern and Central-Western Brazil, 2009-2010. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 32, n. 3, p. 237-242, 2012.

SILVA, F. D. F.; TONIETTI, P. O.; ESPINOZA, L. R. L.; BRANDÃO, P. E.; RICHTZENHAIN, L. J.; GREGORI, F. Development of primers for sequencing the NSP1, NSP3, and VP6 genes of the group A porcine rotavirus. **Semina: ciências agrárias**, v. 35, n. 2, P. 901-904, 2014.

SIMONETTI, F. L.; TEPPA, E.; CHERNOMORETZ, A.; NIELSEN, M.; MARINO BUSLJE, C. MISTIC: Mutual information server to infer coevolution. **Nucleic Acids Research**, v. 41, p. W8-14, 2013.

SMITH, G. J.; VIJAYKRISHNA, D.; BAHL, J.; LYCETT, S. J.; WOROBAY, M.; PYBUS, O. G.; MA, S. K.; CHEUNG, C. L.; RAGHWANI, J.; BHATT, S.; PEIRIS, J. S. Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. **Nature**, v. 459, p. 1122-1125, 2009.

SMITH, T. C.; HARPER, A. L.; NAIR, R.; WARDYN, S. E.; HANSON, B. M.; FERGUSON, D. D.; DRESSLER, A. E. Emerging swine zoonoses. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, v. 11, n. 9, p. 1225-1234, 2011.

SONG, D. S.; KANG, B. K.; OH, J. S.; HA, G. W.; YANG, J. S.; MOON, H. J.; JANG, Y. S.; PARK, B. K. Multiplex reverse transcription-PCR for rapid differential detection of porcine epidemic diarrhea virus, transmissible gastroenteritis virus, and porcine group A rotavirus. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 18, n. 3, p. 278-281, 2006.

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

STOBART, C. C.; LEE, A. S.; LU, X.; DENISON, M. R. Temperature-sensitive mutants and revertants in the coronavirus nonstructural protein 5 protease (3CLpro) define residues involved in long-distance communication and regulation of protease activity. **Journal of virology**, v. 86, n. 9, p. 4801-4810, 2012.

STUPKA, J. A.; DEGIUSEPPE, J. I.; PARRA, G. I. Increased frequency of rotavirus G3P[8] and G12P[8] in Argentina during 2008-2009: whole-genome characterization of emerging G12P[8] strains. **Journal of Clinical Virology**, v. 54, n. 2, p. 162-167, 2012.

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

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEU, M.; KUMAR, S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, n. 10, p. 2731-2739, 2011.

THAN, V. T.; PARK, J. H.; CHUNG, I. S.; KIM, J. B.; KIM, W. Whole-genome sequence analysis of a Korean G11P[25] rotavirus strain identifies several porcine-human reassortant events. **Archives of Virology**, v. 158, n. 11, p. 2385-2393, 2013.

THEUNS, S.; DESMARETS, L. M. B.; HEYLEN, E.; ZELLER, M.; DEDEURWAERDER, A.; ROUKAERTS, I. D. M.; VAN RANST, M.; MATTHIJNSSENS, J.; NAUWYNCK, H. J. Porcine group A rotaviruses with heterogeneous VP7 and VP4 genotype combinations can be found together with enteric bacteria on Belgian swine farms. **Veterinary Microbiology**, v. 172, n. 1-2, p. 23-34, 2014.

THEUNS, S.; HEYLEN, E.; ZELLER, M.; ROUKAERTS, I. D. M.; DESMARETS, L. M. B.; 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, n. 2, p. 1043-1057, 2015.

THONGPRACHUM, A.; KHARIM, P.; SAEKHOW, P.; PANTIP, C.; PEERAKOME, S.; USHIJIMA, H.; MANEEKAR, N. Analysis of the VP6 gene of human and porcine group A rotavirus strains with unusual subgroup specificities. **Journal of Medical Virology**, v. 81, 183-191, 2009.

TONIETTI, P. O.; DA HORA, A. S.; SILVA, F. D. F.; 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. **The Scientific World Journal**, v. 2013, 4 pages, 2013a.

TONIETTI, P. O.; HORA, A. S.; SILVA, F. D. F.; RUIZ, V. L.; GREGORI, F. Phylogenetic analyses of the VP4 and VP7 genes of porcine group A rotaviruses in sao paulo state, Brazil: First Identification of G5P[23] in piglets. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 8, p. 2750-2753, 2013b.

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

TRASK, S. D.; MCDONALD, S. M.; PATTON, J. T. Structural insights into the coupling of virion assembly and rotavirus replication. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 3, p. 165-177, 2012.

TROJNAR, E.; SACHSENRODER, J.; TWARDZIOK, S.; REETZ, J.; 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, n.11, p. 136-142, 2013.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). **Livestock and poultry**: world markets and trade-current report. United States of America, 2015. Disponível em: <http://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/livestock_poultry.pdf>. Acessado em: 14 out. 2015.

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.

WANG, Y. H.; KOBAYASHI, N.; NAGASHIMA, S.; ZHOU, X.; GHOSH, S.; PENG, J. S.; HU, Q.; ZHOU, D. J.; YANG, Z. Q. Full genomic analysis of a porcine-bovine

reassortant G4P[6] rotavirus strain R479 isolated from an infant in China. **Journal of Medical Virology**, v. 82, n. 6, p. 1094-1102, 2010.

WEILE, C.; GARDNER, P. P.; HEDEGAARD, M. M.; VINTHER, J. Use of tiling array data and RNA secondary structure predictions to identify noncoding RNA genes. **BMC Genomics**, v. 8, p. 244, 2007.

WOROBAY, M.; HOLMES, E. C. Evolutionary aspects of recombination in RNA viruses. **Journal of General Virology**, v. 80, n. 10, p. 2535–2543, 1999.

ZÁRATE, S.; ESPINOSA, R.; ROMERO, P.; MÉNDEZ, E.; ARIAS, C. F.; LÓPEZ, S. The VP5 domain of VP4 can mediate attachment of rotaviruses to cells. **Journal of Virology**, v. 74, n. 2, p. 593-599, 2000.

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

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.

ZHANG, S.; MCDONALD, P. W.; THOMPSON, T. A.; DENNIS, A. F.; AKOPOV, A.; KIRKNESS, E. F.; PATTON, J. T.; MCDONALD, S. M. Analysis of human rotaviruses from a single location over an 18-year time span suggests that protein coadaptation confluences gene constellations. **Journal of Virology**, v. 88, n. 17, p. 9842-9863, 2014.

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.

ZLOTOWSKI, P.; CORRÊA, A. M. R.; BARCELLOS, D. E. S.N; CRUZ, C. E. F.; ASANOME, W.; BARRY, A. F.; ALFIERI, A. A.; DRIEMEIER, D. Intestinal lesions in pigs affected with postweaning multisystemic wasting syndrome. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n. 6, p. 313-318, 2008.

APÊNDICE A – Números de acesso (*accession numbers*) no *Genbank* das sequências para cada um dos genótipos das 12 amostras descritas neste estudo

Amostra	NSP1	NSP2	NSP3	NSP4	NSP5	VP1	VP2	VP3	VP4	VP6	VP7
ROTA01	KC855054	KJ482274	KC855057	KJ482328	KJ482353	KJ482382	KJ482409	KJ482436	KJ482460	KC855060	KJ482509
ROTA06	KJ482249	KJ482279	KJ482302	KJ482332	KJ482358	KJ482387	KJ482414	KJ482441	KJ482465	KJ482487	KJ482520
ROTA07	KJ482250	KJ482280	KJ482303	KJ482333	KJ482377	KJ482388	KJ482415	KJ482442	KJ482466	KJ482488	KJ482511
ROTA08	KJ482251	KJ482281	KJ482304	KJ482334	KJ482359	KJ482389	KJ482416	KJ482443	KJ482467	KJ482489	KJ482512
ROTA09	KJ482252	KJ482282	KJ482305	KJ482335	KJ482378	KJ482390	KJ482417	KJ482444	KJ482468	KJ482490	KJ482521
ROTA10	KJ482253	KJ482283	KJ482306	KJ482336	KJ482360	KJ482391	KJ482418	KJ482445	KJ482469	KJ482491	KJ482513
ROTA11	KJ482254	KJ482284	KJ482307	KJ482337	KJ482361	KJ482392	KJ482419	KJ482446	KJ482470	KJ482492	KJ482522
ROTA12	KJ482255	KJ482285	KJ482308	KJ482338	KJ482362	KJ482393	KJ482420	KJ482447	KJ482471	KJ482493	KJ482523
ROTA14	KJ482257	KJ482287	KJ482310	KJ482340	KJ482364	KJ482395	KJ482422	KJ482448	KJ482473	KJ482494	KJ482525
ROTA15	KJ482258	KJ482288	KJ482311	KJ482341	KJ482365	KJ482396	KJ482423	KJ482449	KJ482474	KJ482495	KJ482526
ROTA17	KJ482260	KJ482289	KJ482313	KJ482343	KJ482366	KJ482397	KJ482425	KJ482450	KJ482476	KJ482496	KJ482528
ROTA24	KJ482267	KJ482291	KJ482320	KJ482348	KJ482371	KJ482402	KJ482429	KJ482455	KJ482480	KJ482498	KJ482531

APÊNDICE B – Matriz de similaridade nucleotídica da região consensual das sequências de rotavírus geradas neste estudo frente às demais representativas do genotipo G3 (VP7) depositadas no *Genbank*. Em destaque, valores máximos e mínimos destacados no texto. São Paulo, 2015.

Seq->	PGRV2	PGRV4	PGRV10	PGRV19	A131	12R006	CMP48	AU-1	RV10109	Arg5812	RUBV3	E30	ROTA08	ROTA09
PGRV2	ID	0,993	0,914	0,966	0,89	0,858	0,878	0,868	0,858	0,871	0,792	0,809	0,853	0,984
PGRV4	0,993	ID	0,911	0,96	0,894	0,854	0,877	0,867	0,859	0,867	0,792	0,807	0,849	0,99
PGRV10	0,914	0,911	ID	0,917	0,885	0,864	0,886	0,882	0,869	0,885	0,792	0,798	0,858	0,912
PGRV19	0,966	0,96	0,917	ID	0,887	0,862	0,877	0,875	0,864	0,885	0,801	0,811	0,853	0,962
A131	0,89	0,894	0,885	0,887	ID	0,863	0,875	0,868	0,862	0,856	0,807	0,818	0,851	0,889
12R006	0,858	0,854	0,864	0,862	0,863	ID	0,92	0,877	0,88	0,865	0,798	0,801	0,876	0,856
CMP48	0,878	0,877	0,886	0,877	0,875	0,92	ID	0,893	0,885	0,878	0,802	0,811	0,882	0,877
AU-1	0,868	0,867	0,882	0,875	0,868	0,877	0,893	ID	0,909	0,96	0,797	0,807	0,882	0,867
RV10109	0,858	0,859	0,869	0,864	0,862	0,88	0,885	0,909	ID	0,911	0,792	0,797	0,862	0,856
Arg5812	0,871	0,867	0,885	0,885	0,856	0,865	0,878	0,96	0,911	ID	0,796	0,804	0,869	0,872
RUBV3	0,792	0,792	0,792	0,801	0,807	0,798	0,802	0,797	0,792	0,796	ID	0,849	0,802	0,793
E30	0,809	0,807	0,798	0,811	0,818	0,801	0,811	0,807	0,797	0,804	0,849	ID	0,798	0,805
ROTA08	0,853	0,849	0,858	0,853	0,851	0,876	0,882	0,882	0,862	0,869	0,802	0,798	ID	0,849
ROTA09	0,984	0,99	0,912	0,962	0,889	0,856	0,877	0,867	0,856	0,872	0,793	0,805	0,849	ID

APÊNDICE C – Matriz de similaridade nucleotídica da região consensual das sequências de rotavírus geradas neste estudo frente às demais representativas do genotipo G5 (VP7) depositadas no *genbank*. Em destaque, valores máximos e mínimos. São Paulo, 2015.

Seq->	PIGSP3	PIGSP2	PGRV18	PGRV16	OSU	CMP178	12R008	C134	LL4260	IAL28	KH210	KJ44	ROTA17	ROTA07	ROTA24	ROTA01
PIGSP3	ID	0,998	0,998	0,998	0,925	0,845	0,828	0,849	0,832	0,846	0,804	0,912	0,843	0,825	0,932	0,817
PIGSP2	0,998	ID	1	1	0,926	0,846	0,829	0,85	0,834	0,845	0,803	0,914	0,842	0,827	0,93	0,818
PGRV18	0,998	1	ID	1	0,926	0,846	0,829	0,85	0,834	0,845	0,803	0,914	0,842	0,827	0,93	0,818
PGRV16	0,998	1	1	ID	0,926	0,846	0,829	0,85	0,834	0,845	0,803	0,914	0,842	0,827	0,93	0,818
OSU	0,925	0,926	0,926	0,926	ID	0,865	0,836	0,864	0,853	0,875	0,828	0,987	0,869	0,854	0,947	0,838
CMP178	0,845	0,846	0,846	0,846	0,865	ID	0,845	0,839	0,846	0,871	0,818	0,853	0,863	0,843	0,852	0,84
12R008	0,828	0,829	0,829	0,829	0,836	0,845	ID	0,874	0,882	0,849	0,868	0,829	0,838	0,886	0,846	0,889
C134	0,849	0,85	0,85	0,85	0,864	0,839	0,874	ID	0,871	0,853	0,854	0,854	0,847	0,868	0,86	0,865
LL4260	0,832	0,834	0,834	0,834	0,853	0,846	0,882	0,871	ID	0,846	0,872	0,843	0,836	0,852	0,85	0,852
IAL28	0,846	0,845	0,845	0,845	0,875	0,871	0,849	0,853	0,846	ID	0,835	0,868	0,921	0,845	0,867	0,834
KH210/	0,804	0,803	0,803	0,803	0,828	0,818	0,868	0,854	0,872	0,835	ID	0,818	0,822	0,846	0,82	0,847
KJ44	0,912	0,914	0,914	0,914	0,987	0,853	0,829	0,854	0,843	0,868	0,818	ID	0,863	0,843	0,937	0,828
ROTA17	0,843	0,842	0,842	0,842	0,869	0,863	0,838	0,847	0,836	0,921	0,822	0,863	ID	0,829	0,858	0,821
ROTA07	0,825	0,827	0,827	0,827	0,854	0,843	0,886	0,868	0,852	0,845	0,846	0,843	0,829	ID	0,843	0,98
ROTA24	0,932	0,93	0,93	0,93	0,947	0,852	0,846	0,86	0,85	0,867	0,82	0,937	0,858	0,843	ID	0,829
ROTA01	0,817	0,818	0,818	0,818	0,838	0,84	0,889	0,865	0,852	0,834	0,847	0,828	0,821	0,98	0,829	ID

APÊNDICE D – Matriz de similaridade nucleotídica da região consensual das sequências de rotavírus geradas neste estudo frente às demais representativas do genotipo G9 (VP7) depositadas no *genbank*. Em destaque, valores máximos e mínimos. São Paulo, 2015.

Seq->	R136	BA201	es12588	RMC321	B3458	Arg4288	BE2001	BRA82	PGRV11	PGRV21	JP35	CMP003	RV0084	PRG9235	12R003	3BS	ROTA10	ROTA11	ROTA12	ROTA14	ROTA15
R136	ID	0,988	0,989	0,97	0,996	0,994	0,923	0,922	0,932	0,927	0,916	0,954	0,906	0,92	0,922	0,913	0,926	0,927	0,926	0,927	0,927
BA201	0,988	ID	0,983	0,961	0,987	0,985	0,914	0,914	0,923	0,92	0,914	0,946	0,897	0,914	0,913	0,906	0,918	0,918	0,916	0,918	0,918
es12588	0,989	0,983	ID	0,964	0,988	0,987	0,92	0,922	0,929	0,924	0,919	0,954	0,906	0,92	0,922	0,913	0,923	0,924	0,923	0,924	0,924
RMC321	0,97	0,961	0,964	ID	0,968	0,967	0,924	0,922	0,932	0,927	0,919	0,961	0,916	0,92	0,927	0,915	0,926	0,927	0,926	0,927	0,927
B3458	0,996	0,987	0,988	0,968	ID	0,996	0,923	0,92	0,931	0,927	0,915	0,953	0,905	0,919	0,92	0,911	0,924	0,926	0,924	0,926	0,926
Arg4288	0,994	0,985	0,987	0,967	0,996	ID	0,923	0,919	0,929	0,926	0,914	0,952	0,904	0,918	0,919	0,91	0,923	0,924	0,923	0,924	0,924
BE2001	0,923	0,914	0,92	0,924	0,923	0,923	ID	0,897	0,91	0,907	0,909	0,909	0,907	0,915	0,913	0,906	0,9	0,901	0,9	0,901	0,901
BRA82	0,922	0,914	0,922	0,922	0,92	0,919	0,897	ID	0,961	0,952	0,907	0,911	0,889	0,9	0,937	0,884	0,954	0,955	0,954	0,955	0,955
PGRV11	0,932	0,923	0,929	0,932	0,931	0,929	0,91	0,961	ID	0,955	0,922	0,922	0,909	0,911	0,949	0,897	0,959	0,961	0,959	0,961	0,961
PGRV21	0,927	0,92	0,924	0,927	0,927	0,926	0,907	0,952	0,955	ID	0,91	0,914	0,896	0,914	0,94	0,9	0,954	0,955	0,954	0,955	0,955
JP35	0,916	0,914	0,919	0,919	0,915	0,914	0,909	0,907	0,922	0,91	ID	0,904	0,904	0,91	0,915	0,904	0,91	0,91	0,909	0,91	0,91
CMP003	0,954	0,946	0,954	0,961	0,953	0,952	0,909	0,911	0,922	0,914	0,904	ID	0,905	0,91	0,913	0,907	0,913	0,914	0,913	0,914	0,914
RV0084	0,906	0,897	0,906	0,916	0,905	0,904	0,907	0,889	0,909	0,896	0,904	0,905	ID	0,907	0,902	0,897	0,898	0,9	0,898	0,9	0,9
PRG9235	0,92	0,914	0,92	0,92	0,919	0,918	0,915	0,9	0,911	0,914	0,91	0,91	0,907	ID	0,904	0,902	0,907	0,909	0,907	0,909	0,909
12R003	0,922	0,913	0,922	0,927	0,92	0,919	0,913	0,937	0,949	0,94	0,915	0,913	0,902	0,904	ID	0,898	0,941	0,942	0,941	0,942	0,942
3BS	0,913	0,906	0,913	0,915	0,911	0,91	0,906	0,884	0,897	0,9	0,904	0,907	0,897	0,902	0,898	ID	0,888	0,889	0,888	0,889	0,889
ROTA10	0,926	0,918	0,923	0,926	0,924	0,923	0,9	0,954	0,959	0,954	0,91	0,913	0,898	0,907	0,941	0,888	ID	0,998	0,997	0,998	0,998
ROTA11	0,927	0,918	0,924	0,927	0,926	0,924	0,901	0,955	0,961	0,955	0,91	0,914	0,9	0,909	0,942	0,889	0,998	ID	0,998	1	1
ROTA12	0,926	0,916	0,923	0,926	0,924	0,923	0,9	0,954	0,959	0,954	0,909	0,913	0,898	0,907	0,941	0,888	0,997	0,998	ID	0,998	0,998
ROTA14	0,927	0,918	0,924	0,927	0,926	0,924	0,901	0,955	0,961	0,955	0,91	0,914	0,9	0,909	0,942	0,889	0,998	1	0,998	ID	1
ROTA15	0,927	0,918	0,924	0,927	0,926	0,924	0,901	0,955	0,961	0,955	0,91	0,914	0,9	0,909	0,942	0,889	0,998	1	0,998	1	ID

APÊNDICE E – Matriz de similaridade nucleotídica da região consensual das sequências de rotavírus geradas neste estudo frente às demais representativas do genotipo G11 (VP7) depositadas no *genbank*. Em destaque, valores máximos e mínimos. São Paulo, 2015.

Seq->	YM	CEM06	F6-4	12R021	JJ37	EC2184	KTM368	Dhaka6	Matlab36	PO-13	ROTA06
YM	ID	0,822	0,863	0,774	0,845	0,857	0,915	0,913	0,911	0,621	0,847
CEM06	0,822	ID	0,878	0,792	0,8	0,84	0,805	0,804	0,801	0,585	0,845
F6P4	0,863	0,878	ID	0,776	0,851	0,886	0,861	0,859	0,857	0,628	0,918
12R021	0,774	0,792	0,776	ID	0,872	0,798	0,789	0,788	0,785	0,583	0,774
JJ37	0,845	0,8	0,851	0,872	ID	0,859	0,861	0,859	0,857	0,633	0,857
EC2184	0,857	0,84	0,886	0,798	0,859	ID	0,865	0,864	0,862	0,628	0,865
KTM368	0,915	0,805	0,861	0,789	0,861	0,865	ID	0,998	0,996	0,641	0,853
Dhaka6	0,913	0,804	0,859	0,788	0,859	0,864	0,998	ID	0,997	0,641	0,852
Matlab36	0,911	0,801	0,857	0,785	0,857	0,862	0,996	0,997	ID	0,638	0,849
PO-13	0,621	0,585	0,628	0,583	0,633	0,628	0,641	0,641	0,638	ID	0,626
ROTA06	0,847	0,845	0,918	0,774	0,857	0,865	0,853	0,852	0,849	0,626	ID

APÊNDICE F – Matriz de similaridade nucleotídica da região consensual das sequências de rotavírus geradas neste estudo frente às demais representativas do genotipo P[6] (VP4) depositadas no *genbank*. Em destaque, valores máximos e mínimos. São Paulo, 2015.

Seq->	ROTA08	ROTA17	ROTA24	ROTA06	BRA844	HSP180	BRA838	FGP65	Gottfried	Arg4605	IALRN377	IALRN376	PGRV33	PGRV34	PGRV29	NB244	NB150	BE2001	OSU
ROTA08	ID	0,937	0,941	0,998	0,896	0,888	0,892	0,905	0,802	0,937	0,894	0,896	0,946	0,946	0,961	0,897	0,904	0,856	0,802
ROTA17	0,937	ID	0,914	0,935	0,884	0,882	0,879	0,896	0,807	0,926	0,877	0,878	0,927	0,927	0,931	0,884	0,889	0,858	0,807
ROTA24	0,941	0,914	ID	0,939	0,882	0,864	0,875	0,885	0,799	0,911	0,873	0,874	0,934	0,934	0,934	0,875	0,884	0,848	0,799
ROTA06	0,998	0,935	0,939	ID	0,894	0,889	0,893	0,907	0,8	0,938	0,893	0,894	0,945	0,945	0,96	0,896	0,905	0,858	0,8
BRA844	0,896	0,884	0,882	0,894	ID	0,92	0,987	0,904	0,804	0,92	0,89	0,892	0,899	0,899	0,894	0,894	0,922	0,833	0,804
HSP180	0,888	0,882	0,864	0,889	0,92	ID	0,93	0,905	0,81	0,915	0,896	0,897	0,892	0,892	0,886	0,905	0,927	0,844	0,81
BRA838	0,892	0,879	0,875	0,893	0,987	0,93	ID	0,908	0,804	0,924	0,889	0,89	0,897	0,897	0,889	0,893	0,929	0,834	0,804
FGP65	0,905	0,896	0,885	0,907	0,904	0,905	0,908	ID	0,8	0,941	0,894	0,896	0,915	0,915	0,903	0,907	0,911	0,844	0,8
Gottfried	0,802	0,807	0,799	0,8	0,804	0,81	0,804	0,8	ID	0,813	0,796	0,798	0,804	0,804	0,807	0,799	0,815	0,813	1
Arg4605	0,937	0,926	0,911	0,938	0,92	0,915	0,924	0,941	0,813	ID	0,904	0,905	0,933	0,933	0,929	0,905	0,922	0,869	0,813
IALRN377	0,894	0,877	0,873	0,893	0,89	0,896	0,889	0,894	0,796	0,904	ID	0,998	0,881	0,881	0,886	0,969	0,897	0,822	0,796
IALRN376	0,896	0,878	0,874	0,894	0,892	0,897	0,89	0,896	0,798	0,905	0,998	ID	0,882	0,882	0,888	0,969	0,899	0,824	0,798
PGRV33	0,946	0,927	0,934	0,945	0,899	0,892	0,897	0,915	0,804	0,933	0,881	0,882	ID	1	0,941	0,89	0,905	0,847	0,804
PGRV34	0,946	0,927	0,934	0,945	0,899	0,892	0,897	0,915	0,804	0,933	0,881	0,882	1	ID	0,941	0,89	0,905	0,847	0,804
PGRV29	0,961	0,931	0,934	0,96	0,894	0,886	0,889	0,903	0,807	0,929	0,886	0,888	0,941	0,941	ID	0,889	0,897	0,858	0,807
NB244	0,897	0,884	0,875	0,896	0,894	0,905	0,893	0,907	0,799	0,905	0,969	0,969	0,89	0,89	0,889	ID	0,901	0,828	0,799
NB150	0,904	0,889	0,884	0,905	0,922	0,927	0,929	0,911	0,815	0,922	0,897	0,899	0,905	0,905	0,897	0,901	ID	0,845	0,815
BE2001	0,856	0,858	0,848	0,858	0,833	0,844	0,834	0,844	0,813	0,869	0,822	0,824	0,847	0,847	0,858	0,828	0,845	ID	0,813
OSU	0,802	0,807	0,799	0,8	0,804	0,81	0,804	0,8	1	0,813	0,796	0,798	0,804	0,804	0,807	0,799	0,815	0,813	ID

APÊNDICE G – Matriz de similaridade nucleotídica da região consensual das sequências de rotavírus geradas neste estudo frente às demais representativas do genotipo P[13] (VP4) depositadas no *genbank*. Em destaque, valores máximos e mínimos. São Paulo, 2015.

Seq->	PGRV8	PGRV4	PGRV20	PGRV2	PGRV10	PGRV21	HP140	HP113	12R041	CMP178	160-01	ROTA09	ROTA01	ROTA07
PGRV8	ID	1	0,853	1	0,769	0,853	0,893	0,893	0,84	0,858	0,773	0,986	0,804	0,795
PGRV4	1	ID	0,853	1	0,769	0,853	0,893	0,893	0,84	0,858	0,773	0,986	0,804	0,795
PGRV20	0,853	0,853	ID	0,853	0,779	1	0,843	0,843	0,849	0,836	0,777	0,864	0,809	0,801
PGRV2	1	1	0,853	ID	0,769	0,853	0,893	0,893	0,84	0,858	0,773	0,986	0,804	0,795
PGRV10	0,769	0,769	0,779	0,769	ID	0,779	0,783	0,783	0,752	0,767	0,747	0,782	0,774	0,763
PGRV21	0,853	0,853	1	0,853	0,779	ID	0,843	0,843	0,849	0,836	0,777	0,864	0,809	0,801
HP140	0,893	0,893	0,843	0,893	0,783	0,843	ID	1	0,836	0,861	0,793	0,894	0,808	0,799
HP113	0,893	0,893	0,843	0,893	0,783	0,843	1	ID	0,836	0,861	0,793	0,894	0,808	0,799
12R041	0,84	0,84	0,849	0,84	0,752	0,849	0,836	0,836	ID	0,84	0,777	0,839	0,795	0,79
CMP178	0,858	0,858	0,836	0,858	0,767	0,836	0,861	0,861	0,84	ID	0,773	0,856	0,801	0,801
160-01	0,773	0,773	0,777	0,773	0,747	0,777	0,793	0,793	0,777	0,773	ID	0,78	0,792	0,782
ROTA09	0,986	0,986	0,864	0,986	0,782	0,864	0,894	0,894	0,839	0,856	0,78	ID	0,812	0,804
ROTA01	0,804	0,804	0,809	0,804	0,774	0,809	0,808	0,808	0,795	0,801	0,792	0,812	ID	0,97
ROTA07	0,795	0,795	0,801	0,795	0,763	0,801	0,799	0,799	0,79	0,801	0,782	0,804	0,97	ID

APÊNDICE H – Matriz de similaridade nucleotídica da região consensual das sequências de rotavírus geradas neste estudo frente às demais representativas do genotipo P[23] (VP4) depositadas no *genbank*. Em destaque, valores máximos e mínimos. São Paulo, 2015.

Seq->	ROTA10	ROTA11	ROTA12	ROTA14	ROTA15	12R046	3BS	PRG942	CMP48	VEN/A34	PGRV13	PGRV16
ROTA10	ID	0,996	0,992	0,996	0,996	0,879	0,894	0,879	0,84	0,908	0,853	0,853
ROTA11	0,996	ID	0,988	1	1	0,879	0,894	0,883	0,84	0,911	0,849	0,849
ROTA12	0,992	0,988	ID	0,988	0,988	0,872	0,886	0,872	0,834	0,9	0,846	0,846
ROTA14	0,996	1	0,988	ID	1	0,879	0,894	0,883	0,84	0,911	0,849	0,849
ROTA15	0,996	1	0,988	1	ID	0,879	0,894	0,883	0,84	0,911	0,849	0,849
12R046	0,879	0,879	0,872	0,879	0,879	ID	0,916	0,876	0,848	0,9	0,854	0,848
3BS	0,894	0,894	0,886	0,894	0,894	0,916	ID	0,87	0,845	0,897	0,862	0,853
PRG942	0,879	0,883	0,872	0,883	0,883	0,876	0,87	ID	0,835	0,894	0,84	0,829
CMP48	0,84	0,84	0,834	0,84	0,84	0,848	0,845	0,835	ID	0,845	0,892	0,884
VEN/A34	0,908	0,911	0,9	0,911	0,911	0,9	0,897	0,894	0,845	ID	0,848	0,845
PGRV13	0,853	0,849	0,846	0,849	0,849	0,854	0,862	0,84	0,892	0,848	ID	0,958
PGRV16	0,853	0,849	0,846	0,849	0,849	0,848	0,853	0,829	0,884	0,845	0,958	ID

APÊNDICE I – Matriz de similaridade nucleotídica da região consensual das seqüências de rotavírus geradas neste estudo frente às demais representativas do genotipo I5 (VP6) depositadas no *genbank*. Em destaque, valores máximos e mínimos. São Paulo, 2015.

Seq->	3BS	OSU	YM	A253	A131	PRG921	BE2001	Mc323	ROTA01	ROTA06	ROTA07	ROTA08	ROTA09	ROTA10	ROTA11	ROTA12	ROTA14	ROTA15	ROTA17	ROTA24
3BS	ID	0,876	0,904	0,876	0,875	0,934	0,961	0,931	0,93	0,926	0,927	0,923	0,929	0,925	0,93	0,93	0,928	0,926	0,923	0,925
OSU	0,876	ID	0,959	0,959	0,954	0,876	0,877	0,88	0,876	0,876	0,876	0,874	0,876	0,87	0,875	0,875	0,875	0,872	0,884	0,88
YM	0,904	0,959	ID	0,963	0,953	0,903	0,906	0,909	0,904	0,906	0,904	0,902	0,904	0,898	0,903	0,903	0,903	0,901	0,914	0,907
A253	0,876	0,959	0,963	ID	0,95	0,876	0,879	0,881	0,88	0,88	0,879	0,876	0,879	0,873	0,878	0,878	0,878	0,876	0,887	0,883
A131	0,875	0,954	0,953	0,95	ID	0,872	0,873	0,877	0,877	0,876	0,876	0,872	0,874	0,869	0,873	0,873	0,873	0,871	0,878	0,877
PRG921	0,934	0,876	0,903	0,876	0,872	ID	0,934	0,941	0,932	0,939	0,934	0,937	0,933	0,93	0,934	0,934	0,933	0,93	0,928	0,938
BE2001	0,961	0,877	0,906	0,879	0,873	0,934	ID	0,937	0,93	0,935	0,93	0,926	0,933	0,927	0,932	0,932	0,93	0,928	0,925	0,93
Mc323	0,931	0,88	0,909	0,881	0,877	0,941	0,937	ID	0,939	0,938	0,94	0,937	0,935	0,93	0,934	0,934	0,934	0,932	0,924	0,941
ROTA01	0,93	0,876	0,904	0,88	0,877	0,932	0,93	0,939	ID	0,953	0,983	0,938	0,937	0,93	0,935	0,935	0,935	0,933	0,926	0,944
ROTA06	0,926	0,876	0,906	0,88	0,876	0,939	0,935	0,938	0,953	ID	0,97	0,945	0,942	0,938	0,942	0,942	0,941	0,938	0,924	0,948
ROTA07	0,927	0,876	0,904	0,879	0,876	0,934	0,93	0,94	0,983	0,97	ID	0,937	0,934	0,928	0,933	0,933	0,933	0,93	0,923	0,945
ROTA08	0,923	0,874	0,902	0,876	0,872	0,937	0,926	0,937	0,938	0,945	0,937	ID	0,968	0,966	0,97	0,97	0,969	0,967	0,92	0,964
ROTA09	0,929	0,876	0,904	0,879	0,874	0,933	0,933	0,935	0,937	0,942	0,934	0,968	ID	0,991	0,996	0,996	0,994	0,992	0,923	0,968
ROTA10	0,925	0,87	0,898	0,873	0,869	0,93	0,927	0,93	0,938	0,928	0,966	0,991	ID	0,995	0,995	0,993	0,994	0,92	0,964	
ROTA11	0,93	0,875	0,903	0,878	0,873	0,934	0,932	0,934	0,935	0,942	0,933	0,97	0,996	0,995	ID	1	0,998	0,996	0,924	0,969
ROTA12	0,93	0,875	0,903	0,878	0,873	0,934	0,932	0,934	0,935	0,942	0,933	0,97	0,996	0,995	1	ID	0,998	0,996	0,924	0,969
ROTA14	0,928	0,875	0,903	0,878	0,873	0,933	0,93	0,934	0,935	0,941	0,933	0,969	0,994	0,993	0,998	0,998	ID	0,996	0,924	0,969
ROTA15	0,926	0,872	0,901	0,876	0,871	0,93	0,928	0,932	0,933	0,938	0,93	0,967	0,992	0,994	0,996	0,996	0,996	ID	0,922	0,967
ROTA17	0,923	0,884	0,914	0,887	0,878	0,928	0,925	0,924	0,926	0,924	0,923	0,92	0,923	0,92	0,924	0,924	0,924	0,922	ID	0,929
ROTA24	0,925	0,88	0,907	0,883	0,877	0,938	0,93	0,941	0,944	0,948	0,945	0,964	0,968	0,964	0,969	0,969	0,969	0,967	0,929	ID

APÊNDICE J– Matriz de similaridade nucleotídica da região consensual das sequências de rotavírus geradas neste estudo frente às demais representativas do genotipo R1 (VP1) depositadas no *genbank*. Em destaque, valores máximos e mínimos. São Paulo, 2015

Seq->	Gottfried	A253	NMTL	OSU	F8P4	3BS	BE2001	YM	A131	CMP45	PRG921	B3458	IAL28	RU172	Arg7500	Arg4605	EC2184	NB150	ROTA01	ROTA06	ROTA07	ROTA08	ROTA09	ROTA10	ROTA11	ROTA12	ROTA14	ROTA15	ROTA17	ROTA24	
Gottfried	ID	0,824	0,878	0,971	0,925	0,86	0,927	0,864	0,828	0,866	0,858	0,857	0,864	0,873	0,857	0,907	0,86	0,857	0,849	0,925	0,851	0,918	0,904	0,933	0,933	0,933	0,933	0,933	0,922	0,934	
A253	0,824	ID	0,81	0,837	0,828	0,806	0,83	0,936	0,902	0,797	0,822	0,804	0,81	0,813	0,804	0,84	0,858	0,86	0,813	0,844	0,813	0,831	0,833	0,842	0,842	0,842	0,84	0,842	0,848	0,848	
NMTL	0,878	0,81	ID	0,875	0,857	0,877	0,873	0,853	0,819	0,862	0,875	0,877	0,886	0,931	0,873	0,869	0,851	0,851	0,851	0,898	0,853	0,875	0,882	0,875	0,875	0,875	0,878	0,875	0,878	0,887	
OSU	0,971	0,837	0,875	ID	0,936	0,855	0,934	0,878	0,848	0,86	0,858	0,849	0,857	0,858	0,853	0,907	0,864	0,86	0,849	0,922	0,851	0,915	0,904	0,94	0,94	0,94	0,936	0,94	0,925	0,927	
F8P4	0,925	0,828	0,857	0,936	ID	0,844	0,907	0,862	0,833	0,853	0,849	0,855	0,844	0,853	0,858	0,895	0,846	0,844	0,849	0,905	0,851	0,911	0,911	0,92	0,92	0,92	0,916	0,92	0,918	0,911	
3BS	0,86	0,806	0,877	0,855	0,844	ID	0,851	0,848	0,813	0,916	0,869	0,866	0,862	0,858	0,867	0,86	0,839	0,837	0,924	0,866	0,925	0,853	0,857	0,851	0,851	0,851	0,855	0,851	0,857	0,853	
BE2001	0,927	0,83	0,873	0,934	0,907	0,851	ID	0,866	0,831	0,853	0,862	0,849	0,86	0,858	0,849	0,898	0,862	0,857	0,846	0,924	0,848	0,889	0,895	0,934	0,934	0,934	0,933	0,934	0,904	0,925	
YM	0,864	0,936	0,853	0,878	0,862	0,848	0,866	ID	0,949	0,837	0,862	0,842	0,857	0,848	0,842	0,88	0,916	0,911	0,853	0,88	0,853	0,866	0,866	0,877	0,877	0,877	0,875	0,877	0,878	0,88	
A131	0,828	0,902	0,819	0,848	0,833	0,813	0,831	0,949	ID	0,813	0,82	0,804	0,815	0,811	0,802	0,84	0,873	0,869	0,824	0,844	0,824	0,828	0,826	0,842	0,842	0,842	0,84	0,842	0,842	0,844	
CMP45	0,866	0,797	0,862	0,86	0,853	0,916	0,853	0,837	0,813	ID	0,849	0,862	0,866	0,849	0,855	0,867	0,839	0,839	0,92	0,867	0,922	0,857	0,862	0,857	0,857	0,857	0,86	0,857	0,855	0,855	
PRG921	0,858	0,822	0,875	0,858	0,849	0,869	0,862	0,862	0,82	0,849	ID	0,862	0,857	0,867	0,858	0,864	0,857	0,855	0,862	0,882	0,864	0,851	0,855	0,857	0,857	0,857	0,86	0,857	0,851	0,862	
B3458	0,857	0,804	0,877	0,849	0,855	0,866	0,849	0,842	0,804	0,862	0,862	ID	0,92	0,896	0,989	0,858	0,833	0,83	0,855	0,862	0,857	0,858	0,851	0,855	0,855	0,855	0,858	0,855	0,853	0,853	
IAL28	0,864	0,81	0,886	0,857	0,844	0,862	0,86	0,857	0,815	0,866	0,857	0,92	ID	0,893	0,916	0,857	0,855	0,84	0,853	0,867	0,855	0,853	0,864	0,857	0,857	0,857	0,86	0,857	0,862	0,857	
RU172	0,873	0,813	0,931	0,858	0,853	0,858	0,858	0,848	0,811	0,849	0,867	0,896	0,893	ID	0,893	0,871	0,839	0,835	0,848	0,887	0,849	0,866	0,877	0,869	0,869	0,869	0,869	0,869	0,873	0,875	
Arg7500	0,857	0,804	0,873	0,853	0,858	0,867	0,849	0,842	0,802	0,855	0,858	0,989	0,916	0,893	ID	0,857	0,828	0,824	0,855	0,862	0,857	0,855	0,851	0,858	0,858	0,858	0,862	0,858	0,855	0,853	
Arg4605	0,907	0,84	0,869	0,907	0,895	0,86	0,898	0,88	0,84	0,867	0,864	0,858	0,857	0,871	0,857	ID	0,86	0,864	0,853	0,902	0,855	0,887	0,898	0,913	0,913	0,913	0,909	0,913	0,898	0,907	
EC2184	0,86	0,858	0,851	0,864	0,846	0,839	0,862	0,916	0,873	0,839	0,857	0,833	0,855	0,839	0,828	0,86	ID	0,965	0,849	0,869	0,851	0,851	0,862	0,86	0,86	0,86	0,858	0,86	0,86	0,864	
NB150	0,857	0,86	0,851	0,86	0,844	0,837	0,857	0,911	0,869	0,839	0,855	0,83	0,84	0,835	0,824	0,864	0,965	ID	0,848	0,862	0,849	0,846	0,86	0,862	0,862	0,862	0,86	0,862	0,853	0,867	
ROTA01	0,849	0,813	0,851	0,849	0,849	0,924	0,846	0,853	0,824	0,92	0,862	0,855	0,853	0,848	0,855	0,853	0,849	0,848	ID	0,867	0,998	0,855	0,858	0,848	0,848	0,848	0,848	0,851	0,848	0,858	0,848
ROTA06	0,925	0,844	0,898	0,922	0,905	0,866	0,924	0,88	0,844	0,867	0,882	0,862	0,867	0,887	0,862	0,902	0,869	0,862	0,867	ID	0,869	0,891	0,895	0,958	0,958	0,958	0,962	0,958	0,911	0,958	
ROTA07	0,851	0,813	0,853	0,851	0,851	0,925	0,848	0,853	0,824	0,922	0,864	0,857	0,855	0,849	0,857	0,855	0,851	0,849	0,998	0,869	ID	0,857	0,86	0,849	0,849	0,849	0,853	0,849	0,86	0,849	
ROTA08	0,918	0,831	0,875	0,915	0,911	0,853	0,889	0,866	0,828	0,857	0,851	0,858	0,853	0,866	0,855	0,887	0,851	0,846	0,855	0,891	0,857	ID	0,949	0,902	0,902	0,902	0,898	0,902	0,922	0,909	
ROTA09	0,904	0,833	0,882	0,904	0,911	0,857	0,895	0,866	0,826	0,862	0,855	0,851	0,864	0,877	0,851	0,898	0,862	0,86	0,858	0,895	0,86	0,949	ID	0,902	0,902	0,902	0,898	0,902	0,931	0,909	
ROTA10	0,933	0,842	0,875	0,94	0,92	0,851	0,934	0,877	0,842	0,857	0,857	0,855	0,857	0,869	0,858	0,913	0,86	0,862	0,848	0,958	0,849	0,902	0,902	ID	1	1	0,996	1	0,918	0,951	
ROTA11	0,933	0,842	0,875	0,94	0,92	0,851	0,934	0,877	0,842	0,857	0,857	0,855	0,857	0,869	0,858	0,913	0,86	0,862	0,848	0,958	0,849	0,902	0,902	1	ID	1	0,996	1	0,918	0,951	
ROTA12	0,933	0,842	0,875	0,94	0,92	0,851	0,934	0,877	0,842	0,857	0,857	0,855	0,857	0,869	0,858	0,913	0,86	0,862	0,848	0,958	0,849	0,902	0,902	1	1	ID	0,996	1	0,918	0,951	
ROTA14	0,933	0,84	0,878	0,936	0,916	0,855	0,933	0,875	0,84	0,86	0,86	0,858	0,86	0,869	0,862	0,909	0,858	0,86	0,851	0,962	0,853	0,898	0,898	0,996	0,996	0,996	ID	0,996	0,915	0,947	
ROTA15	0,933	0,842	0,875	0,94	0,92	0,851	0,934	0,877	0,842	0,857	0,857	0,855	0,857	0,869	0,858	0,913	0,86	0,862	0,848	0,958	0,849	0,902	0,902	1	1	1	0,996	ID	0,918	0,951	
ROTA17	0,922	0,848	0,878	0,925	0,918	0,857	0,904	0,878	0,842	0,855	0,851	0,853	0,862	0,873	0,855	0,898	0,86	0,853	0,858	0,911	0,86	0,922	0,931	0,918	0,918	0,918	0,915	0,918	ID	0,918	
ROTA24	0,934	0,848	0,887	0,927	0,911	0,853	0,925	0,88	0,844	0,855	0,862	0,853	0,857	0,875	0,853	0,907	0,864	0,867	0,848	0,958	0,849	0,909	0,909	0,951	0,951	0,951	0,947	0,951	0,918	ID	

APÊNDICE K– Matriz de similaridade nucleotídica da região consensual das sequências de rotavírus geradas neste estudo frente às demais representativas do genotipo C1 (VP2) depositadas no *genbank*. Em destaque, valores máximos e mínimos. São Paulo, 2015

Seq->	CMP45	RU172	NMTL	YM	OSU	3BS	PRG921	Gottfried	12R041	VEN/M37	BE2001	Arg4605	Mc323	IAL28	B3458	Matlab36	ROTA01	ROTA06	ROTA07	ROTA08	ROTA09	ROTA10	ROTA11	ROTA12	ROTA14	ROTA15	ROTA17	ROTA24
CMP45	ID	0,912	0,904	0,908	0,915	0,901	0,898	0,904	0,9	0,917	0,911	0,909	0,904	0,885	0,859	0,885	0,904	0,905	0,906	0,897	0,91	0,901	0,904	0,903	0,901	0,901	0,895	0,902
RU172	0,912 ID		0,908	0,908	0,927	0,91	0,903	0,918	0,906	0,925	0,918	0,921	0,926	0,878	0,859	0,884	0,91	0,927	0,917	0,898	0,926	0,912	0,912	0,914	0,912	0,912	0,911	0,909
NMTL	0,904	0,908 ID		0,92	0,931	0,912	0,901	0,906	0,918	0,924	0,917	0,919	0,902	0,861	0,854	0,871	0,912	0,915	0,912	0,905	0,918	0,909	0,908	0,909	0,909	0,908	0,905	0,904
YM	0,908	0,908	0,92 ID		0,937	0,922	0,91	0,918	0,917	0,947	0,919	0,928	0,913	0,878	0,862	0,872	0,919	0,921	0,915	0,912	0,924	0,92	0,921	0,922	0,92	0,92	0,904	0,906
OSU	0,915	0,927	0,931	0,937 ID		0,928	0,921	0,932	0,927	0,949	0,934	0,949	0,927	0,881	0,858	0,879	0,936	0,948	0,939	0,922	0,948	0,938	0,938	0,941	0,938	0,938	0,941	0,919
3BS	0,901	0,91	0,912	0,922	0,928 ID		0,902	0,909	0,918	0,926	0,914	0,93	0,908	0,872	0,853	0,873	0,909	0,912	0,91	0,907	0,917	0,903	0,903	0,905	0,903	0,903	0,909	0,9
PRG921	0,898	0,903	0,901	0,91	0,921	0,902 ID		0,912	0,906	0,92	0,918	0,914	0,907	0,874	0,856	0,873	0,901	0,923	0,912	0,901	0,915	0,906	0,908	0,907	0,906	0,906	0,893	0,906
Gottfried	0,904	0,918	0,906	0,918	0,932	0,909	0,912 ID		0,917	0,927	0,915	0,928	0,915	0,876	0,856	0,877	0,906	0,921	0,909	0,907	0,918	0,904	0,905	0,906	0,904	0,904	0,909	0,916
12R041	0,9	0,906	0,918	0,917	0,927	0,918	0,906	0,917 ID		0,927	0,949	0,924	0,902	0,87	0,849	0,869	0,903	0,915	0,909	0,908	0,914	0,914	0,912	0,915	0,914	0,912	0,903	0,907
VEN/M37	0,917	0,925	0,924	0,947	0,949	0,926	0,92	0,927	0,927 ID		0,931	0,941	0,93	0,881	0,87	0,887	0,925	0,935	0,927	0,915	0,938	0,931	0,931	0,933	0,931	0,931	0,918	0,915
BE2001	0,911	0,918	0,917	0,919	0,934	0,914	0,918	0,915	0,949	0,931 ID		0,925	0,915	0,876	0,848	0,872	0,909	0,927	0,916	0,906	0,927	0,922	0,922	0,924	0,922	0,922	0,907	0,907
Arg4605	0,909	0,921	0,919	0,928	0,949	0,93	0,914	0,928	0,924	0,941	0,925 ID		0,918	0,876	0,856	0,875	0,924	0,935	0,927	0,918	0,932	0,922	0,922	0,924	0,922	0,922	0,919	0,916
Mc323	0,904	0,926	0,902	0,913	0,927	0,908	0,907	0,915	0,902	0,93	0,915	0,918 ID		0,884	0,862	0,886	0,904	0,912	0,906	0,902	0,921	0,909	0,909	0,912	0,909	0,909	0,908	0,9
IAL28	0,885	0,878	0,861	0,878	0,881	0,872	0,874	0,876	0,87	0,881	0,876	0,876	0,884 ID		0,86	0,883	0,865	0,876	0,869	0,877	0,883	0,87	0,873	0,872	0,87	0,87	0,864	0,87
B3458	0,859	0,859	0,854	0,862	0,858	0,853	0,856	0,856	0,849	0,87	0,848	0,856	0,862	0,86 ID		0,935	0,852	0,851	0,854	0,849	0,857	0,845	0,847	0,848	0,845	0,845	0,845	0,853
Matlab36	0,885	0,884	0,871	0,872	0,879	0,873	0,873	0,877	0,869	0,887	0,872	0,875	0,886	0,883	0,935 ID		0,878	0,875	0,879	0,869	0,881	0,871	0,871	0,872	0,871	0,871	0,873	0,866
ROTA01	0,904	0,91	0,912	0,919	0,936	0,909	0,901	0,906	0,903	0,925	0,909	0,924	0,904	0,865	0,852	0,878 ID		0,943	0,979	0,903	0,933	0,921	0,921	0,921	0,921	0,921	0,927	0,9
ROTA06	0,905	0,927	0,915	0,921	0,948	0,912	0,923	0,921	0,915	0,935	0,927	0,935	0,912	0,876	0,851	0,875	0,943 ID		0,952	0,909	0,957	0,944	0,944	0,947	0,944	0,944	0,931	0,905
ROTA07	0,906	0,917	0,912	0,915	0,939	0,91	0,912	0,909	0,909	0,927	0,916	0,927	0,906	0,869	0,854	0,879	0,979	0,952 ID		0,903	0,942	0,927	0,927	0,929	0,927	0,927	0,927	0,9
ROTA08	0,897	0,898	0,905	0,912	0,922	0,907	0,901	0,907	0,908	0,915	0,906	0,918	0,902	0,877	0,849	0,869	0,903	0,909	0,903 ID		0,915	0,906	0,906	0,905	0,906	0,904	0,901	0,915
ROTA09	0,91	0,926	0,918	0,924	0,948	0,917	0,915	0,918	0,914	0,938	0,927	0,932	0,921	0,883	0,857	0,881	0,933	0,957	0,942	0,915 ID		0,97	0,97	0,973	0,97	0,97	0,933	0,912
ROTA10	0,901	0,912	0,909	0,92	0,938	0,903	0,906	0,904	0,914	0,931	0,922	0,922	0,909	0,87	0,845	0,871	0,921	0,944	0,927	0,906	0,97 ID		0,997	0,997	1	0,998	0,924	0,905
ROTA11	0,904	0,912	0,908	0,921	0,938	0,903	0,908	0,905	0,912	0,931	0,922	0,922	0,909	0,873	0,847	0,871	0,921	0,944	0,927	0,906	0,97	0,997 ID		0,997	0,997	0,997	0,926	0,905
ROTA12	0,903	0,914	0,909	0,922	0,941	0,905	0,907	0,906	0,915	0,933	0,924	0,924	0,912	0,872	0,848	0,872	0,921	0,947	0,929	0,905	0,973	0,997	0,997 ID		0,997	0,997	0,925	0,904
ROTA14	0,901	0,912	0,909	0,92	0,938	0,903	0,906	0,904	0,914	0,931	0,922	0,922	0,909	0,87	0,845	0,871	0,921	0,944	0,927	0,906	0,97	1	0,997	0,997 ID		0,998	0,924	0,905
ROTA15	0,901	0,912	0,908	0,92	0,938	0,903	0,906	0,904	0,912	0,931	0,922	0,922	0,909	0,87	0,845	0,871	0,921	0,944	0,927	0,904	0,97	0,998	0,997	0,997	0,998 ID		0,924	0,905
ROTA17	0,895	0,911	0,905	0,904	0,941	0,909	0,893	0,909	0,903	0,918	0,907	0,919	0,908	0,864	0,845	0,873	0,927	0,931	0,927	0,901	0,933	0,924	0,926	0,925	0,924	0,924 ID		0,904
ROTA24	0,902	0,909	0,904	0,906	0,919	0,9	0,906	0,916	0,907	0,915	0,907	0,916	0,9	0,87	0,853	0,866	0,9	0,905	0,9	0,915	0,912	0,905	0,905	0,904	0,905	0,905	0,904 ID	

APÊNDICE L– Matriz de similaridade nucleotídica da região consensual das sequências de rotavírus geradas neste estudo frente às demais representativas do genotipo M1 (VP3) depositadas no *genbank*. Em destaque, valores máximos e mínimos. São Paulo, 2015

Seq->	EC2184	F8P4	3BS	YM	VEN/A131	VEN/A253	OSU	Gottfried	PRG921	3BS	B3458	Mc323	Arg4605	BE2001	Matlab36	Dhaka6	HSP180	IAL28	BE00048	rj552
EC2184	ID	0,921	0,941	0,917	0,896	0,897	0,927	0,921	0,884	0,941	0,896	0,889	0,948	0,914	0,877	0,881	0,946	0,907	0,904	0,902
F8P4	0,921	ID	0,912	0,909	0,886	0,884	0,929	0,909	0,876	0,912	0,892	0,884	0,929	0,914	0,879	0,882	0,924	0,904	0,911	0,902
3BS	0,941	0,912	ID	0,904	0,881	0,882	0,911	0,897	0,872	1	0,882	0,877	0,939	0,897	0,862	0,865	0,936	0,891	0,891	0,886
YM	0,917	0,909	0,904	ID	0,902	0,902	0,936	0,907	0,892	0,904	0,886	0,877	0,916	0,929	0,881	0,881	0,917	0,909	0,892	0,909
VEN/A131	0,896	0,886	0,881	0,902	ID	0,988	0,953	0,889	0,852	0,881	0,869	0,849	0,899	0,907	0,847	0,852	0,894	0,874	0,871	0,872
VEN/A253	0,897	0,884	0,882	0,902	0,988	ID	0,951	0,889	0,852	0,882	0,867	0,85	0,901	0,906	0,847	0,852	0,894	0,876	0,872	0,874
OSU	0,927	0,929	0,911	0,936	0,953	0,951	ID	0,927	0,886	0,911	0,899	0,886	0,936	0,946	0,884	0,887	0,927	0,912	0,911	0,909
Gottfried	0,921	0,909	0,897	0,907	0,889	0,889	0,927	ID	0,876	0,897	0,901	0,882	0,911	0,914	0,887	0,891	0,912	0,906	0,917	0,907
PRG921	0,884	0,876	0,872	0,892	0,852	0,852	0,886	0,876	ID	0,872	0,871	0,902	0,892	0,891	0,867	0,871	0,884	0,879	0,881	0,877
3BS	0,941	0,912	1	0,904	0,881	0,882	0,911	0,897	0,872	ID	0,882	0,877	0,939	0,897	0,862	0,865	0,936	0,891	0,891	0,886
B3458	0,896	0,892	0,882	0,886	0,869	0,867	0,899	0,901	0,871	0,882	ID	0,877	0,897	0,899	0,864	0,864	0,902	0,943	0,931	0,946
Mc323	0,889	0,884	0,877	0,877	0,849	0,85	0,886	0,882	0,902	0,877	ID	0,902	0,902	0,884	0,872	0,879	0,892	0,882	0,886	0,882
Arg4605	0,948	0,929	0,939	0,916	0,899	0,901	0,936	0,911	0,892	0,939	0,897	0,902	ID	0,914	0,887	0,891	0,951	0,906	0,909	0,901
BE2001	0,914	0,914	0,897	0,929	0,907	0,906	0,946	0,914	0,891	0,897	0,899	0,884	0,914	ID	0,886	0,889	0,919	0,907	0,896	0,901
Matlab36	0,877	0,879	0,862	0,881	0,847	0,847	0,884	0,887	0,867	0,862	0,864	0,872	0,887	0,886	ID	0,993	0,877	0,859	0,859	0,855
Dhaka6	0,881	0,882	0,865	0,881	0,852	0,852	0,887	0,891	0,871	0,865	0,864	0,879	0,891	0,889	0,993	ID	0,881	0,859	0,862	0,855
HSP180	0,946	0,924	0,936	0,917	0,894	0,894	0,927	0,912	0,884	0,936	0,902	0,892	0,951	0,919	0,877	0,881	ID	0,911	0,907	0,906
IAL28	0,907	0,904	0,891	0,909	0,874	0,876	0,912	0,906	0,879	0,891	0,943	0,882	0,906	0,907	0,859	0,859	0,911	ID	0,927	0,984
BE00048	0,904	0,911	0,891	0,892	0,871	0,872	0,911	0,917	0,881	0,891	0,931	0,886	0,909	0,896	0,859	0,862	0,907	0,927	ID	0,926
rj552	0,902	0,902	0,886	0,909	0,872	0,874	0,909	0,907	0,877	0,886	0,946	0,882	0,901	0,901	0,855	0,855	0,906	0,984	0,926	ID
ROTA01	0,936	0,912	0,926	0,911	0,887	0,886	0,924	0,914	0,881	0,926	0,891	0,884	0,943	0,911	0,876	0,879	0,931	0,899	0,891	0,897
ROTA06	0,921	0,921	0,919	0,927	0,902	0,902	0,941	0,922	0,906	0,919	0,896	0,887	0,924	0,927	0,877	0,881	0,929	0,914	0,917	0,916
ROTA07	0,936	0,924	0,932	0,938	0,902	0,902	0,944	0,921	0,926	0,932	0,901	0,899	0,938	0,934	0,882	0,886	0,943	0,921	0,912	0,914
ROTA08	0,911	0,916	0,894	0,912	0,911	0,911	0,943	0,921	0,874	0,894	0,882	0,871	0,906	0,912	0,869	0,872	0,906	0,899	0,896	0,902
ROTA09	0,932	0,926	0,932	0,907	0,889	0,889	0,927	0,906	0,889	0,932	0,887	0,891	0,946	0,912	0,882	0,886	0,939	0,899	0,896	0,894
ROTA10	0,936	0,926	0,936	0,911	0,892	0,892	0,931	0,909	0,889	0,936	0,889	0,891	0,949	0,916	0,879	0,882	0,943	0,901	0,897	0,896
ROTA11	0,934	0,924	0,934	0,909	0,891	0,891	0,929	0,907	0,887	0,934	0,887	0,889	0,948	0,914	0,877	0,881	0,941	0,899	0,896	0,894
ROTA12	0,938	0,924	0,934	0,912	0,892	0,892	0,932	0,911	0,891	0,934	0,887	0,891	0,948	0,916	0,877	0,881	0,941	0,902	0,896	0,897
ROTA14	0,934	0,924	0,934	0,909	0,891	0,891	0,929	0,907	0,887	0,934	0,887	0,889	0,948	0,914	0,877	0,881	0,941	0,899	0,896	0,894
ROTA15	0,931	0,921	0,932	0,906	0,887	0,887	0,926	0,904	0,884	0,932	0,884	0,886	0,944	0,911	0,874	0,877	0,938	0,896	0,892	0,891
ROTA17	0,926	0,914	0,916	0,901	0,869	0,869	0,907	0,896	0,886	0,916	0,879	0,879	0,929	0,897	0,862	0,865	0,934	0,894	0,886	0,889
ROTA24	0,929	0,909	0,926	0,911	0,901	0,901	0,934	0,916	0,881	0,926	0,884	0,892	0,949	0,911	0,872	0,876	0,938	0,894	0,899	0,889

APÊNDICE M– Matriz de similaridade nucleotídica da região consensual das sequências de rotavírus geradas neste estudo frente às demais representativas do genotipo A8 (NSP1) depositadas no *genbank*. Em destaque, valores máximos e mínimos. São Paulo, 2015

Seq->	YM	Arg4605	Arg4671	PRG921	F7P4	Mc323	BE2001	F8P4	3BS	CMP45	Gottfried	HSP180	ROTA01	ROTA06	ROTA07	ROTA08	ROTA09	ROTA10	ROTA11	ROTA12	ROTA14	ROTA15	ROTA17	ROTA24
YM	ID	0,886	0,877	0,906	0,906	0,871	0,867	0,912	0,814	0,812	0,875	0,799	0,851	0,848	0,852	0,881	0,81	0,854	0,854	0,855	0,836	0,855	0,808	0,803
Arg4605	0,886 ID		0,92	0,871	0,871	0,896	0,906	0,875	0,835	0,835	0,925	0,821	0,88	0,884	0,881	0,935	0,83	0,88	0,88	0,88	0,868	0,881	0,834	0,827
Arg4671	0,877	0,92 ID		0,866	0,867	0,882	0,895	0,871	0,832	0,823	0,91	0,821	0,897	0,894	0,898	0,918	0,832	0,878	0,889	0,879	0,862	0,878	0,832	0,821
PRG921	0,906	0,871	0,866 ID		0,891	0,857	0,858	0,893	0,804	0,801	0,868	0,796	0,847	0,845	0,848	0,874	0,808	0,851	0,844	0,851	0,829	0,851	0,806	0,801
F7P4	0,906	0,871	0,867	0,891 ID		0,872	0,86	0,923	0,819	0,823	0,873	0,8	0,839	0,844	0,839	0,87	0,808	0,849	0,844	0,85	0,835	0,85	0,805	0,803
Mc323	0,871	0,896	0,882	0,857	0,872 ID		0,873	0,869	0,819	0,82	0,898	0,824	0,861	0,866	0,862	0,889	0,828	0,864	0,864	0,865	0,846	0,864	0,823	0,819
BE2001	0,867	0,906	0,895	0,858	0,86	0,873 ID		0,868	0,826	0,83	0,924	0,812	0,871	0,873	0,872	0,911	0,826	0,883	0,875	0,884	0,859	0,884	0,819	0,821
F8P4	0,912	0,875	0,871	0,893	0,923	0,869	0,868 ID		0,81	0,812	0,873	0,797	0,844	0,847	0,845	0,875	0,811	0,851	0,85	0,852	0,834	0,852	0,812	0,802
3BS	0,814	0,835	0,832	0,804	0,819	0,819	0,826	0,81 ID		0,891	0,833	0,864	0,821	0,819	0,821	0,835	0,857	0,83	0,819	0,832	0,844	0,831	0,848	0,86
CMP45	0,812	0,835	0,823	0,801	0,823	0,82	0,83	0,812	0,891 ID		0,82	0,845	0,817	0,818	0,817	0,839	0,857	0,831	0,818	0,832	0,835	0,83	0,837	0,856
Gottfried	0,875	0,925	0,91	0,868	0,873	0,898	0,924	0,873	0,833	0,82 ID		0,817	0,883	0,888	0,884	0,926	0,828	0,887	0,881	0,887	0,86	0,887	0,821	0,81
HSP180	0,799	0,821	0,821	0,796	0,8	0,824	0,812	0,797	0,864	0,845	0,817 ID		0,816	0,812	0,816	0,827	0,911	0,826	0,817	0,828	0,839	0,826	0,93	0,941
ROTA01	0,851	0,88	0,897	0,847	0,839	0,861	0,871	0,844	0,821	0,817	0,883	0,816 ID		0,897	0,998	0,888	0,819	0,866	0,929	0,867	0,845	0,865	0,822	0,808
ROTA06	0,848	0,884	0,894	0,845	0,844	0,866	0,873	0,847	0,819	0,818	0,888	0,812	0,897 ID		0,898	0,891	0,82	0,864	0,879	0,864	0,839	0,863	0,818	0,81
ROTA07	0,852	0,881	0,898	0,848	0,839	0,862	0,872	0,845	0,821	0,817	0,884	0,816	0,998	0,898 ID		0,889	0,819	0,867	0,93	0,867	0,845	0,866	0,822	0,808
ROTA08	0,881	0,935	0,918	0,874	0,87	0,889	0,911	0,875	0,835	0,839	0,926	0,827	0,888	0,891	0,889 ID		0,837	0,889	0,891	0,889	0,867	0,888	0,837	0,827
ROTA09	0,81	0,83	0,832	0,808	0,808	0,828	0,826	0,811	0,857	0,857	0,828	0,911 ID		0,82	0,819	0,837	ID	0,833	0,826	0,835	0,882	0,834	0,924	0,88
ROTA10	0,854	0,88	0,878	0,851	0,849	0,864	0,883	0,851	0,83	0,831	0,887	0,826	0,866	0,864	0,867	0,889	0,833 ID		0,934	0,998	0,916	0,997	0,828	0,821
ROTA11	0,854	0,88	0,889	0,844	0,844	0,864	0,875	0,85	0,819	0,818	0,881	0,817	0,929	0,879	0,93	0,891	0,826	0,934 ID		0,934	0,914	0,933	0,824	0,808
ROTA12	0,855	0,88	0,879	0,851	0,85	0,865	0,884	0,852	0,832	0,832	0,887	0,828	0,867	0,864	0,867	0,889	0,835	0,998	0,934 ID		0,918	0,996	0,828	0,823
ROTA14	0,836	0,868	0,862	0,829	0,835	0,846	0,859	0,834	0,844	0,835	0,86	0,839	0,845	0,839	0,845	0,867	0,882	0,916	0,914	0,918 ID		0,917	0,907	0,834
ROTA15	0,855	0,881	0,878	0,851	0,85	0,864	0,884	0,852	0,831	0,83	0,887	0,826	0,865	0,863	0,866	0,888	0,834	0,997	0,933	0,996	0,917 ID		0,828	0,821
ROTA17	0,808	0,834	0,832	0,806	0,805	0,823	0,819	0,812	0,848	0,837	0,821	0,93	0,822	0,818	0,822	0,837	0,924	0,828	0,824	0,828	0,907	0,828 ID		0,875
ROTA24	0,803	0,827	0,821	0,801	0,803	0,819	0,821	0,802	0,86	0,856	0,81	0,941	0,808	0,81	0,808	0,827	0,88	0,821	0,808	0,823	0,834	0,821	0,875 ID	

APÊNDICE N– Matriz de similaridade nucleotídica da região consensual das sequências de rotavírus geradas neste estudo frente às demais representativas do genotipo N1 (NSP2) depositadas no *genbank*. Em destaque, valores máximos e mínimos. São Paulo, 2015

Seq->	EC2184	B3458	HST327	HSP180	RV10109	Arg7500	Arg6653	Arg4671	Arg4605	Mc323	BE2001	YM	CMP45	PRG921	A131	VEN/A411	A253	OSU	Gottfried	3BS	F7P4	SWRV1	SWRV2	SWRV7	SWRV3	SWRV5	2CR	RU172	ROTA01	ROTA06	ROTA07	ROTA08	ROTA09	ROTA10	ROTA11	ROTA12	ROTA14	ROTA15	ROTA17	ROTA24	
EC2184	ID	0,943	0,89	0,916	0,856	0,894	0,897	0,91	0,909	0,949	0,935	0,954	0,941	0,947	0,858	0,861	0,886	0,927	0,94	0,919	0,87	0,945	0,948	0,947	0,883	0,869	0,868	0,867	0,933	0,869	0,932	0,946	0,874	0,875	0,875	0,876	0,876	0,883	0,948		
B3458	0,943	ID	0,889	0,918	0,86	0,889	0,891	0,911	0,906	0,966	0,927	0,957	0,937	0,937	0,86	0,859	0,886	0,923	0,931	0,915	0,864	0,939	0,94	0,937	0,867	0,863	0,848	0,86	0,929	0,863	0,925	0,938	0,862	0,863	0,863	0,862	0,862	0,862	0,867	0,94	
HST327	0,89	0,889	ID	0,892	0,866	0,906	0,908	0,887	0,892	0,895	0,887	0,899	0,892	0,887	0,827	0,824	0,853	0,891	0,9	0,886	0,866	0,879	0,881	0,892	0,878	0,871	0,867	0,863	0,882	0,871	0,879	0,893	0,878	0,879	0,879	0,878	0,878	0,878	0,878	0,881	
HSP180	0,916	0,918	0,892	ID	0,853	0,89	0,892	0,922	0,916	0,927	0,924	0,926	0,925	0,921	0,864	0,866	0,894	0,929	0,93	0,913	0,864	0,917	0,916	0,923	0,87	0,863	0,862	0,878	0,907	0,863	0,903	0,924	0,874	0,875	0,875	0,874	0,874	0,874	0,874	0,87	0,916
RV10109	0,856	0,86	0,866	0,853	ID	0,85	0,852	0,837	0,843	0,853	0,859	0,862	0,859	0,853	0,806	0,807	0,827	0,851	0,853	0,846	0,908	0,854	0,853	0,858	0,909	0,911	0,9	0,878	0,864	0,911	0,861	0,856	0,913	0,911	0,911	0,91	0,91	0,91	0,909	0,853	
Arg7500	0,894	0,889	0,906	0,89	0,85	ID	0,997	0,884	0,881	0,898	0,901	0,894	0,895	0,895	0,834	0,836	0,856	0,891	0,892	0,898	0,87	0,886	0,887	0,893	0,876	0,875	0,86	0,87	0,889	0,875	0,885	0,894	0,878	0,879	0,879	0,878	0,878	0,878	0,876	0,887	
Arg6653	0,897	0,891	0,908	0,892	0,852	0,997	ID	0,886	0,883	0,9	0,903	0,897	0,898	0,898	0,836	0,838	0,859	0,893	0,894	0,9	0,872	0,889	0,89	0,895	0,878	0,877	0,862	0,872	0,891	0,877	0,887	0,897	0,881	0,882	0,882	0,881	0,881	0,881	0,881	0,878	0,89
Arg4671	0,91	0,911	0,887	0,922	0,837	0,884	0,886	ID	0,971	0,917	0,922	0,922	0,906	0,923	0,852	0,853	0,882	0,921	0,931	0,945	0,855	0,913	0,914	0,919	0,87	0,856	0,859	0,869	0,908	0,856	0,905	0,921	0,868	0,869	0,869	0,868	0,868	0,868	0,868	0,87	0,914
Arg4605	0,909	0,906	0,892	0,916	0,843	0,881	0,883	0,971	ID	0,914	0,916	0,921	0,902	0,919	0,855	0,856	0,886	0,922	0,927	0,95	0,856	0,909	0,91	0,916	0,867	0,851	0,86	0,861	0,907	0,851	0,903	0,917	0,864	0,866	0,866	0,864	0,864	0,864	0,864	0,867	0,91
Mc323	0,949	0,966	0,895	0,927	0,853	0,898	0,9	0,917	0,914	ID	0,931	0,961	0,949	0,949	0,859	0,86	0,887	0,925	0,935	0,921	0,867	0,945	0,946	0,946	0,875	0,863	0,861	0,866	0,938	0,863	0,934	0,945	0,867	0,868	0,868	0,867	0,867	0,867	0,875	0,946	
BE2001	0,935	0,927	0,887	0,924	0,859	0,901	0,903	0,922	0,916	0,931	ID	0,935	0,919	0,931	0,861	0,862	0,891	0,932	0,935	0,926	0,883	0,929	0,93	0,938	0,885	0,877	0,871	0,878	0,925	0,877	0,922	0,937	0,883	0,884	0,884	0,883	0,883	0,883	0,883	0,885	0,93
YM	0,954	0,957	0,899	0,926	0,862	0,894	0,897	0,922	0,921	0,961	0,935	ID	0,945	0,951	0,867	0,866	0,895	0,934	0,938	0,929	0,874	0,954	0,955	0,949	0,876	0,864	0,862	0,869	0,937	0,864	0,933	0,948	0,872	0,874	0,874	0,872	0,872	0,872	0,876	0,955	
CMP45	0,941	0,937	0,892	0,925	0,859	0,895	0,898	0,906	0,902	0,949	0,919	0,945	ID	0,941	0,854	0,855	0,879	0,918	0,924	0,914	0,866	0,935	0,937	0,94	0,878	0,867	0,867	0,869	0,926	0,867	0,923	0,939	0,874	0,875	0,875	0,874	0,874	0,874	0,878	0,937	
PRG921	0,947	0,937	0,887	0,921	0,853	0,895	0,898	0,923	0,919	0,949	0,931	0,951	0,941	ID	0,866	0,864	0,894	0,935	0,941	0,925	0,872	0,956	0,959	0,956	0,878	0,868	0,867	0,867	0,948	0,868	0,947	0,957	0,872	0,874	0,874	0,875	0,875	0,875	0,878	0,959	
A131	0,858	0,86	0,827	0,864	0,806	0,834	0,836	0,852	0,855	0,859	0,861	0,867	0,854	0,866	ID	0,996	0,964	0,919	0,895	0,859	0,83	0,871	0,875	0,864	0,826	0,808	0,812	0,815	0,858	0,808	0,856	0,866	0,819	0,82	0,82	0,821	0,821	0,821	0,821	0,826	0,875
VEN/A411	0,861	0,859	0,824	0,866	0,807	0,836	0,838	0,853	0,856	0,86	0,862	0,866	0,855	0,864	0,996	ID	0,961	0,918	0,894	0,86	0,83	0,87	0,874	0,863	0,824	0,807	0,813	0,816	0,859	0,807	0,858	0,864	0,82	0,821	0,821	0,822	0,822	0,822	0,824	0,874	
A253	0,886	0,886	0,853	0,894	0,827	0,856	0,859	0,882	0,886	0,887	0,891	0,895	0,879	0,894	0,964	0,961	ID	0,95	0,926	0,886	0,855	0,894	0,898	0,894	0,854	0,836	0,832	0,842	0,883	0,836	0,882	0,895	0,847	0,848	0,848	0,85	0,85	0,85	0,854	0,898	
OSU	0,927	0,923	0,891	0,929	0,851	0,891	0,893	0,921	0,922	0,925	0,932	0,934	0,918	0,935	0,919	0,918	0,95	ID	0,973	0,927	0,885	0,93	0,933	0,932	0,879	0,868	0,863	0,872	0,918	0,868	0,917	0,933	0,875	0,876	0,876	0,877	0,877	0,877	0,879	0,933	
Gottfried	0,94	0,931	0,9	0,93	0,853	0,892	0,894	0,931	0,927	0,935	0,935	0,938	0,924	0,941	0,895	0,894	0,926	0,973	ID	0,931	0,881	0,929	0,932	0,942	0,884	0,872	0,861	0,868	0,924	0,872	0,923	0,943	0,877	0,878	0,878	0,879	0,879	0,879	0,884	0,932	
3BS	0,919	0,915	0,886	0,913	0,846	0,898	0,9	0,945	0,95	0,921	0,926	0,929	0,914	0,925	0,859	0,86	0,886	0,927	0,931	ID	0,872	0,923	0,924	0,917	0,877	0,868	0,866	0,871	0,91	0,868	0,907	0,918	0,877	0,878	0,878	0,877	0,877	0,877	0,877	0,877	0,924
F7P4	0,87	0,864	0,866	0,864	0,908	0,87	0,872	0,855	0,856	0,867	0,883	0,874	0,866	0,872	0,83	0,83	0,855	0,885	0,881	0,872	ID	0,862	0,866	0,866	0,927	0,921	0,907	0,901	0,87	0,921	0,869	0,867	0,919	0,918	0,918	0,919	0,919	0,919	0,927	0,866	
SWRV1	0,945	0,939	0,879	0,917	0,854	0,886	0,889	0,913	0,909	0,945	0,929	0,954	0,935	0,956	0,871	0,87	0,894	0,93	0,929	0,923	0,862	ID	0,996	0,958	0,869	0,859	0,867	0,86	0,946	0,859	0,942	0,957	0,861	0,862	0,862	0,861	0,861	0,861	0,869	0,996	
SWRV2	0,948	0,94	0,881	0,916	0,853	0,887	0,89	0,914	0,91	0,946	0,93	0,955	0,937	0,959	0,875	0,874	0,898	0,933	0,932	0,924	0,866	0,996	ID	0,959	0,872	0,86	0,868	0,861	0,947	0,86	0,946	0,958	0,862	0,863	0,863	0,864	0,864	0,864	0,872	1	
SWRV7	0,947	0,937	0,892	0,923	0,858	0,893	0,895	0,919	0,916	0,946	0,938	0,949	0,94	0,956	0,864	0,863	0,894	0,932	0,942	0,917	0,866	0,958	0,959	ID	0,875	0,877	0,868	0,87	0,95	0,877	0,947	0,994	0,877	0,878	0,878	0,877	0,877	0,877	0,875	0,959	
SWRV3	0,883	0,867	0,878	0,87	0,909	0,876	0,878	0,87	0,867	0,875	0,885	0,876	0,878	0,878	0,826	0,824	0,854	0,879	0,884	0,877	0,927	0,869	0,872	0,875	ID	0,947	0,91	0,907	0,875	0,947	0,874	0,874	0,948	0,947	0,947	0,948	0,948	0,948	0,948	1	0,872
SWRV5	0,869	0,863	0,871	0,863	0,911	0,875	0,877	0,856	0,851	0,863	0,877	0,864	0,867	0,868	0,808	0,807	0,836	0,868	0,872	0,868	0,921	0,859	0,86	0,877	0,947	ID	0,903	0,903	0,866	1	0,862	0,881	0,965	0,964	0,964	0,963	0,963	0,963	0,947	0,86	
2CR	0,868	0,848	0,867	0,862	0,9	0,86	0,862	0,859	0,86	0,861	0,871	0,862	0,867	0,867	0,812	0,813	0,832	0,863	0,861	0,866	0,907	0,867	0,868	0,868	0,91	0,903	ID	0,905	0,872	0,903	0,869	0,867	0,91	0,909	0,909	0,908	0,908	0,908	0,91	0,868	
RU172	0,867	0,86	0,863	0,878	0,878	0,87	0,872	0,869	0,861	0,866	0,878	0,869	0,869	0,867	0,815	0,816	0,842	0,872	0,868	0,871	0,901	0,86	0,861	0,87	0,907	0,903	0,905	ID	0,868	0,903	0,864	0,874	0,908	0,907	0,907	0,906	0,906	0,906	0,907	0,861	
ROTA01	0,933	0,929	0,882	0,907	0,864	0,889	0,891	0,908	0,907	0,938	0,925	0,937	0,926	0,948	0,858	0,859	0,883	0,918	0,924	0,91	0,87	0,946	0,947	0,95	0,875	0,866	0,872	0,868	ID	0,866	0,996	0,949	0,87	0,871	0,871	0,87	0,87	0,87	0,875	0,947	
ROTA06	0,869	0,863	0,871	0,863																																					

APÊNDICE O– Matriz de similaridade nucleotídica da região consensual das sequências de rotavírus geradas neste estudo frente às demais representativas do genotipo T1 (NSP3) depositadas no *genbank*. Em destaque, valores máximos e mínimos. São Paulo, 2015

Seq->	EC2184	Arg4671	Arg7500	3BS	PRG921	RU172	B3458	YM	12R046	12R002	OSU	rj7363	A131	rj15221	IAL28	A411	NB150	HST327	A253	HSP034	ROTA10	ROTA11	ROTA12	ROTA14	ROTA15
EC2184	ID	0,94	0,863	0,865	0,865	0,87	0,862	0,863	0,875	0,878	0,871	0,871	0,822	0,875	0,865	0,824	0,986	0,956	0,837	0,769	0,881	0,881	0,881	0,881	0,881
Arg4671	0,94 ID		0,851	0,86	0,866	0,862	0,852	0,859	0,876	0,876	0,866	0,859	0,822	0,862	0,865	0,824	0,931	0,919	0,837	0,764	0,876	0,876	0,876	0,876	0,876
Arg7500	0,863	0,851 ID		0,855	0,862	0,855	0,989	0,859	0,865	0,865	0,868	0,975	0,828	0,975	0,866	0,83	0,855	0,851	0,844	0,772	0,876	0,878	0,878	0,878	0,878
3BS	0,865	0,86	0,855 ID		0,928	0,915	0,852	0,873	0,881	0,884	0,87	0,862	0,831	0,863	0,874	0,831	0,86	0,867	0,844	0,767	0,873	0,873	0,873	0,873	0,873
PRG921	0,865	0,866	0,862	0,928 ID		0,931	0,854	0,885	0,882	0,88	0,861	0,862	0,82	0,863	0,877	0,821	0,86	0,86	0,831	0,773	0,87	0,87	0,87	0,87	0,87
RU172	0,87	0,862	0,855	0,915	0,931 ID		0,852	0,886	0,886	0,888	0,867	0,86	0,823	0,861	0,88	0,824	0,863	0,86	0,838	0,778	0,873	0,873	0,873	0,873	0,873
B3458	0,862	0,852	0,989	0,852	0,854	0,852 ID		0,86	0,866	0,866	0,867	0,976	0,825	0,976	0,865	0,828	0,854	0,852	0,841	0,772	0,88	0,88	0,88	0,88	0,88
YM	0,863	0,859	0,859	0,873	0,885	0,886	0,86 ID		0,895	0,878	0,873	0,866	0,835	0,867	0,925	0,835	0,856	0,858	0,847	0,768	0,882	0,882	0,882	0,882	0,882
12R046	0,875	0,876	0,865	0,881	0,882	0,886	0,866	0,895 ID		0,943	0,881	0,875	0,835	0,876	0,886	0,837	0,866	0,866	0,851	0,762	0,883	0,883	0,883	0,883	0,883
12R002	0,878	0,876	0,865	0,884	0,88	0,888	0,866	0,878	0,943 ID		0,871	0,874	0,829	0,875	0,88	0,831	0,87	0,87	0,844	0,773	0,876	0,876	0,876	0,876	0,876
OSU	0,871	0,866	0,868	0,87	0,861	0,867	0,867	0,873	0,881	0,871 ID		0,869	0,936	0,873	0,869	0,938	0,86	0,868	0,951	0,75	0,938	0,938	0,938	0,938	0,938
rj7363	0,871	0,859	0,975	0,862	0,862	0,86	0,976	0,866	0,875	0,874	0,869 ID		0,826	0,995	0,869	0,829	0,863	0,858	0,843	0,773	0,88	0,88	0,88	0,88	0,88
A131	0,822	0,822	0,828	0,831	0,82	0,823	0,825	0,835	0,835	0,829	0,936	0,826 ID		0,83	0,835	0,997	0,815	0,821	0,974	0,724	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89
rj15221	0,875	0,862	0,975	0,863	0,863	0,861	0,976	0,867	0,876	0,875	0,873	0,995	0,83 ID		0,87	0,832	0,865	0,861	0,846	0,777	0,883	0,883	0,883	0,883	0,883
IAL28	0,865	0,865	0,866	0,874	0,877	0,88	0,865	0,925	0,886	0,88	0,869	0,869	0,835	0,87 ID		0,835	0,86	0,863	0,848	0,768	0,875	0,875	0,875	0,875	0,875
A411	0,824	0,824	0,83	0,831	0,821	0,824	0,828	0,835	0,837	0,831	0,938	0,829	0,997	0,832	0,835 ID		0,817	0,823	0,972	0,724	0,892	0,892	0,892	0,892	0,892
NB150	0,986	0,931	0,855	0,86	0,86	0,863	0,854	0,856	0,866	0,87	0,86	0,863	0,815	0,865	0,86	0,817 ID		0,951	0,828	0,764	0,876	0,876	0,876	0,876	0,876
HST327	0,956	0,919	0,851	0,867	0,86	0,86	0,852	0,858	0,866	0,87	0,868	0,858	0,821	0,861	0,863	0,823	0,951 ID		0,833	0,764	0,88	0,88	0,88	0,88	0,88
A253	0,837	0,837	0,844	0,844	0,831	0,838	0,841	0,847	0,851	0,844	0,951	0,843	0,974	0,846	0,848	0,972	0,828	0,833 ID		0,734	0,903	0,903	0,903	0,903	0,903
HSP034	0,769	0,764	0,772	0,767	0,773	0,778	0,772	0,768	0,762	0,773	0,75	0,773	0,724	0,777	0,768	0,724	0,764	0,764	0,734 ID		0,765	0,765	0,765	0,765	0,765
ROTA10	0,881	0,876	0,878	0,873	0,87	0,873	0,88	0,882	0,883	0,876	0,938	0,88	0,89	0,883	0,875	0,892	0,876	0,88	0,903	0,765 ID		1	1	1	1
ROTA11	0,881	0,876	0,878	0,873	0,87	0,873	0,88	0,882	0,883	0,876	0,938	0,88	0,89	0,883	0,875	0,892	0,876	0,88	0,903	0,765	1 ID		1	1	1
ROTA12	0,881	0,876	0,878	0,873	0,87	0,873	0,88	0,882	0,883	0,876	0,938	0,88	0,89	0,883	0,875	0,892	0,876	0,88	0,903	0,765	1	1 ID		1	1
ROTA14	0,881	0,876	0,878	0,873	0,87	0,873	0,88	0,882	0,883	0,876	0,938	0,88	0,89	0,883	0,875	0,892	0,876	0,88	0,903	0,765	1	1	1 ID		1
ROTA15	0,881	0,876	0,878	0,873	0,87	0,873	0,88	0,882	0,883	0,876	0,938	0,88	0,89	0,883	0,875	0,892	0,876	0,88	0,903	0,765	1	1	1	1 ID	

APÊNDICE P– Matriz de similaridade nucleotídica da região consensual das sequências de rotavírus geradas neste estudo frente às demais representativas do genotipo T7 (NSP3) depositadas no *genbank*. Em destaque, valores máximos e mínimos. São Paulo, 2015

Seq->	F8P4	CMP45	HSP180	2CR	BE2001	Arg4605	ROTA01	ROTA06	ROTA07	ROTA08	ROTA09	ROTA17	ROTA24
F8P4	ID	0,899	0,909	0,933	0,87	0,93	0,905	0,918	0,905	0,909	0,907	0,923	0,913
CMP45	0,899	ID	0,917	0,912	0,864	0,913	0,913	0,92	0,916	0,907	0,913	0,913	0,916
HSP180	0,909	0,917	ID	0,926	0,879	0,922	0,955	0,944	0,955	0,919	0,927	0,913	0,931
2CR	0,933	0,912	0,926	ID	0,874	0,923	0,916	0,923	0,916	0,91	0,93	0,92	0,932
BE2001	0,87	0,864	0,879	0,874	ID	0,869	0,887	0,869	0,887	0,865	0,877	0,876	0,877
Arg4605	0,93	0,913	0,922	0,923	0,869	ID	0,916	0,927	0,916	0,907	0,913	0,938	0,916
ROTA01	0,905	0,913	0,955	0,916	0,887	0,916	ID	0,942	0,997	0,91	0,918	0,924	0,922
ROTA06	0,918	0,92	0,944	0,923	0,869	0,927	0,942	ID	0,942	0,912	0,918	0,949	0,92
ROTA07	0,905	0,916	0,955	0,916	0,887	0,916	0,997	0,942	ID	0,91	0,918	0,924	0,922
ROTA08	0,909	0,907	0,919	0,91	0,865	0,907	0,91	0,912	0,91	ID	0,943	0,908	0,943
ROTA09	0,907	0,913	0,927	0,93	0,877	0,913	0,918	0,918	0,918	0,943	ID	0,91	0,986
ROTA17	0,923	0,913	0,913	0,92	0,876	0,938	0,924	0,949	0,924	0,908	0,91	ID	0,912
ROTA24	0,913	0,916	0,931	0,932	0,877	0,916	0,922	0,92	0,922	0,943	0,986	0,912	ID

APÊNDICE Q– Matriz de similaridade nucleotídica da região consensual das sequências de rotavírus geradas neste estudo frente às demais representativas do genotipo E1 (NSP4) depositadas no *genbank*. Em destaque, valores máximos e mínimos. São Paulo, 2015

Seq->	A131	CMP45	OSU	IAL28	VEN/A34	EC2184	Gottfried	385	2CR	PRG921	F8P4	B3458	YM	RU172	Mc323	BE2001	A253	PORV1	PORV2	PORV3	PORV9	PORV10	Arg4605	Arg4671	HSP180	HST327	Arg7500	ROTA01	ROTA06	ROTA07	ROTA08	ROTA09	ROTA10	ROTA11	ROTA12	ROTA14	ROTA15	ROTA17	ROTA24		
A131	ID		0,843	0,894	0,801	0,863	0,861	0,867	0,859	0,851	0,859	0,845	0,819	0,847	0,823	0,847	0,823	0,916	0,861	0,861	0,861	0,859	0,865	0,865	0,863	0,839	0,843	0,809	0,851	0,855	0,851	0,853	0,859	0,831	0,831	0,831	0,831	0,831	0,831	0,863	0,863
CMP45	0,894	ID		0,892	0,859	0,888	0,9	0,871	0,904	0,902	0,886	0,89	0,865	0,904	0,902	0,968	0,938	0,878	0,896	0,896	0,896	0,892	0,882	0,865	0,884	0,886	0,882	0,847	0,89	0,875	0,89	0,873	0,878	0,875	0,875	0,875	0,875	0,875	0,888	0,888	
OSU	0,894	0,892	ID		0,846	0,93	0,9	0,944	0,922	0,912	0,92	0,916	0,871	0,89	0,871	0,894	0,878	0,918	0,93	0,93	0,93	0,94	0,93	0,932	0,934	0,914	0,922	0,857	0,934	0,924	0,934	0,922	0,936	0,878	0,878	0,878	0,878	0,878	0,922	0,924	
IAL28	0,801	0,859	0,846	ID		0,865	0,855	0,844	0,847	0,861	0,851	0,869	0,916	0,867	0,863	0,865	0,84	0,818	0,853	0,853	0,853	0,842	0,859	0,849	0,846	0,863	0,859	0,881	0,859	0,855	0,859	0,853	0,861	0,884	0,884	0,884	0,884	0,884	0,847	0,853	
VEN/A34	0,863	0,888	0,93	0,865	ID		0,92	0,926	0,932	0,922	0,928	0,873	0,886	0,884	0,886	0,886	0,884	0,894	0,932	0,932	0,932	0,928	0,93	0,932	0,936	0,936	0,932	0,869	0,94	0,93	0,94	0,928	0,942	0,876	0,876	0,876	0,876	0,92	0,93		
EC2184	0,861	0,9	0,93	0,855	0,92	ID		0,93	0,928	0,918	0,918	0,918	0,865	0,892	0,884	0,908	0,898	0,884	0,928	0,928	0,928	0,918	0,924	0,926	0,922	0,908	0,93	0,857	0,922	0,914	0,922	0,912	0,926	0,884	0,884	0,884	0,884	0,884	0,92	0,916	
Gottfried	0,867	0,871	0,944	0,844	0,926	0,93	ID		0,926	0,916	0,93	0,916	0,861	0,876	0,863	0,888	0,873	0,888	0,93	0,93	0,93	0,924	0,926	0,94	0,938	0,922	0,94	0,861	0,932	0,914	0,932	0,912	0,928	0,876	0,876	0,876	0,876	0,916	0,916		
385	0,859	0,904	0,922	0,847	0,932	0,928	0,926	ID		0,966	0,934	0,916	0,867	0,902	0,884	0,902	0,882	0,876	0,944	0,944	0,944	0,928	0,934	0,946	0,95	0,926	0,928	0,865	0,94	0,922	0,94	0,92	0,93	0,876	0,876	0,876	0,876	0,928	0,924		
2CR	0,851	0,902	0,912	0,861	0,922	0,918	0,916	0,966	ID		0,92	0,902	0,869	0,888	0,875	0,892	0,869	0,873	0,938	0,938	0,938	0,918	0,928	0,936	0,934	0,916	0,918	0,853	0,926	0,916	0,926	0,914	0,92	0,875	0,875	0,875	0,875	0,914	0,918		
PRG921	0,859	0,886	0,92	0,851	0,922	0,918	0,93	0,934	0,92	ID		0,93	0,861	0,888	0,888	0,898	0,875	0,869	0,922	0,922	0,922	0,916	0,92	0,946	0,948	0,922	0,928	0,861	0,914	0,92	0,914	0,918	0,924	0,873	0,873	0,873	0,873	0,914	0,92		
F8P4	0,845	0,89	0,916	0,869	0,928	0,918	0,916	0,916	0,902	0,93	ID		0,886	0,896	0,886	0,892	0,878	0,857	0,908	0,908	0,908	0,898	0,902	0,926	0,928	0,916	0,92	0,869	0,924	0,898	0,924	0,896	0,914	0,869	0,869	0,869	0,869	0,908	0,906		
B3458	0,819	0,865	0,871	0,916	0,873	0,865	0,861	0,867	0,869	0,861	0,886	ID		0,882	0,876	0,873	0,855	0,835	0,865	0,865	0,865	0,865	0,861	0,867	0,865	0,869	0,876	0,875	0,932	0,882	0,857	0,882	0,855	0,867	0,888	0,888	0,888	0,888	0,865	0,875	
YM	0,847	0,904	0,89	0,867	0,886	0,892	0,876	0,902	0,888	0,888	0,896	0,882	ID		0,904	0,912	0,89	0,873	0,882	0,882	0,882	0,878	0,876	0,89	0,89	0,894	0,882	0,867	0,888	0,876	0,888	0,875	0,884	0,873	0,873	0,873	0,873	0,873	0,878	0,888	
RU172	0,823	0,902	0,871	0,863	0,884	0,884	0,863	0,884	0,875	0,888	0,886	0,876	0,904	ID		0,908	0,894	0,849	0,88	0,88	0,88	0,865	0,875	0,876	0,888	0,888	0,882	0,869	0,886	0,873	0,886	0,871	0,878	0,88	0,88	0,88	0,88	0,88	0,876	0,882	
Mc323	0,847	0,968	0,894	0,865	0,886	0,908	0,888	0,902	0,892	0,898	0,892	0,873	0,912	0,908	ID		0,942	0,88	0,902	0,902	0,902	0,888	0,886	0,896	0,898	0,894	0,898	0,861	0,896	0,88	0,896	0,878	0,888	0,876	0,876	0,876	0,876	0,894	0,892		
BE2001	0,823	0,938	0,878	0,84	0,882	0,898	0,873	0,882	0,869	0,875	0,878	0,855	0,89	0,894	0,942	ID		0,863	0,871	0,871	0,871	0,875	0,865	0,873	0,871	0,884	0,888	0,851	0,876	0,863	0,876	0,861	0,869	0,867	0,867	0,867	0,867	0,867	0,873		
A253	0,916	0,878	0,918	0,818	0,884	0,884	0,888	0,876	0,873	0,869	0,857	0,835	0,873	0,849	0,88	0,863	ID		0,888	0,888	0,888	0,89	0,88	0,884	0,878	0,871	0,875	0,835	0,878	0,882	0,878	0,88	0,88	0,843	0,843	0,843	0,843	0,884	0,886		
PORV1	0,861	0,896	0,93	0,853	0,932	0,928	0,93	0,944	0,938	0,922	0,908	0,865	0,882	0,88	0,902	0,871	0,888	ID		1		1	0,954	0,956	0,942	0,944	0,912	0,932	0,861	0,96	0,958	0,96	0,956	0,958	0,861	0,861	0,861	0,861	0,968	0,938	
PORV2	0,861	0,896	0,93	0,853	0,932	0,928	0,93	0,944	0,938	0,922	0,908	0,865	0,882	0,88	0,902	0,871	0,888	1	ID		1	0,954	0,956	0,942	0,944	0,912	0,932	0,861	0,96	0,958	0,96	0,956	0,958	0,861	0,861	0,861	0,861	0,968	0,938		
PORV3	0,861	0,896	0,93	0,853	0,932	0,928	0,93	0,944	0,938	0,922	0,908	0,865	0,882	0,88	0,902	0,871	0,888	1		ID		1	0,954	0,956	0,942	0,944	0,912	0,932	0,861	0,96	0,958	0,96	0,956	0,958	0,861	0,861	0,861	0,861	0,968	0,938	
PORV9	0,859	0,892	0,94	0,842	0,928	0,918	0,924	0,928	0,918	0,916	0,898	0,861	0,878	0,865	0,888	0,875	0,89	0,954	0,954	0,954	ID	0,954	0,932	0,93	0,922	0,922	0,845	0,95	0,946	0,95	0,944	0,952	0,873	0,873	0,873	0,873	0,873	0,942	0,938		
PORV10	0,865	0,882	0,93	0,859	0,93	0,924	0,926	0,934	0,928	0,92	0,902	0,867	0,876	0,875	0,886	0,865	0,88	0,956	0,956	0,956	0,954	ID	0,934	0,936	0,924	0,92	0,855	0,948	0,942	0,948	0,94	0,942	0,882	0,882	0,882	0,882	0,882	0,932	0,932		
Arg4605	0,865	0,886	0,932	0,849	0,932	0,926	0,94	0,946	0,936	0,946	0,926	0,865	0,89	0,876	0,896	0,873	0,884	0,942	0,942	0,942	0,932	0,934	ID		0,966	0,938	0,942	0,869	0,934	0,93	0,934	0,928	0,936	0,875	0,875	0,875	0,875	0,934	0,92		
Arg4671	0,863	0,884	0,934	0,846	0,936	0,922	0,938	0,95	0,934	0,948	0,928	0,869	0,89	0,888	0,898	0,871	0,878	0,944	0,944	0,944	0,93	0,936	0,966	ID	0,942	0,948	0,863	0,944	0,93	0,944	0,928	0,946	0,863	0,863	0,863	0,863	0,94	0,918			
HSP180	0,839	0,886	0,914	0,863	0,936	0,908	0,922	0,926	0,916	0,922	0,916	0,876	0,894	0,888	0,894	0,884	0,871	0,912	0,912	0,912	0,922	0,924	0,938	0,942	ID	0,926	0,875	0,926	0,914	0,926	0,912	0,924	0,878	0,878	0,878	0,878	0,9	0,91			
HST327	0,843	0,882	0,922	0,859	0,932	0,93	0,94	0,928	0,918	0,928	0,92	0,875	0,882	0,882	0,898	0,888	0,875	0,932	0,932	0,932	0,922	0,92	0,942	0,948	0,926	ID	0,873	0,942	0,92	0,942	0,918	0,93	0,875	0,875	0,875	0,875	0,92	0,914			
Arg7500	0,809	0,847	0,857	0,881	0,869	0,857	0,861	0,865	0,853	0,861	0,869	0,932	0,867	0,869	0,861	0,851	0,835	0,861	0,861	0,861	0,845	0,855	0,869	0,863	0,875	0,873	ID	0,876	0,855	0,876	0,853	0,859	0,882	0,873	0,873	0,873	0,873	0,865	0,859		
ROTA01	0,851	0,89	0,934	0,859	0,94	0,922	0,932	0,94	0,926	0,914	0,924	0,882	0,888	0,886	0,896	0,876	0,878	0,96	0,96	0,96	0,95	0,948	0,934	0,944	0,926	0,942	0,876	ID		0,942	1	0,94	0,954	0,871	0,871	0,871	0,871	0,944	0,942		
ROTA06	0,855	0,875	0,924	0,855	0,93	0,914	0,914	0,922	0,916	0,92	0,898	0,857	0,876	0,873	0,88	0,863	0,882	0,958	0,958	0,958	0,946	0,942	0,93	0,93	0,914	0,92	0,855	0,942	ID		0,942	0,998	0,956	0,859	0,859	0,859	0,859	0,942	0,93		
ROTA07	0,851	0,89	0,934	0,859	0,94	0,922	0,932	0,94	0,926	0,914	0,924	0,882	0,888	0,886	0,896	0,876	0,878	0,96	0,96	0,96	0,95	0,948	0,934	0,944	0,926	0,942	0,876	1	0,942	ID		0,94	0,954	0,871	0,871	0,871	0,871	0,944	0,942		
ROTA08	0,853	0,873	0,922	0,853	0,928	0,912	0,912	0,92	0,914	0,918	0,896	0,855	0,875	0,871	0,																										

APÊNDICE R– Matriz de similaridade nucleotídica da região consensual das sequências de rotavírus geradas neste estudo frente às demais representativas do genotipo H1 (NSP5) depositadas no *genbank*. Em destaque, valores máximos e mínimos. São Paulo, 2015

Seq->	3B5	SWRV4	HST327	HSP180	NB150	SWRV6	SWRV1	SWRV2	SWRV3	CMP45	ba13619	rj1609	BE2001	RU172	F8P4	PRG921	A131	b3458	IAL28	EC2184	A253	OSU	Arg4671	Gottfr1e	Arg7500	Arg4605	ROTA01	ROTA06	ROTA07	ROTA08	ROTA09	ROTA10	ROTA11	ROTA12	ROTA14	ROTA15	ROTA17	ROTA24	
3B5	ID		0,962	0,984	0,944	0,966	0,962	0,94	0,94	0,946	0,966	0,976	0,966	0,98	0,976	0,964	0,964	0,902	0,962	0,928	0,972	0,916	0,964	0,944	0,972	0,968	0,948	0,946	0,966	0,946	0,966	0,968	0,966	0,966	0,966	0,966	0,946	0,94	
SWRV4		0,962 ID		0,974	0,956	0,96	0,972	0,952	0,952	0,958	0,954	0,97	0,96	0,97	0,97	0,966	0,974	0,892	0,956	0,93	0,962	0,91	0,96	0,956	0,968	0,958	0,952	0,958	0,996	0,958	0,976	0,974	0,976	0,976	0,976	0,976	0,976	0,958	0,952
HST327		0,984	0,974 ID		0,956	0,978	0,974	0,952	0,952	0,958	0,958	0,988	0,978	0,984	0,984	0,976	0,976	0,908	0,974	0,944	0,98	0,926	0,976	0,956	0,982	0,98	0,964	0,958	0,978	0,958	0,978	0,98	0,978	0,978	0,978	0,978	0,958	0,952	
HSP180		0,944	0,956	0,956 ID		0,954	0,948	0,984	0,984	0,982	0,934	0,954	0,948	0,948	0,956	0,956	0,956	0,888	0,944	0,936	0,952	0,902	0,95	0,984	0,95	0,944	0,956	0,982	0,96	0,982	0,952	0,96	0,954	0,954	0,954	0,954	0,954	0,982	0,984
NB150		0,966	0,96	0,978	0,954 ID		0,958	0,946	0,946	0,952	0,948	0,972	0,966	0,966	0,972	0,966	0,964	0,902	0,962	0,928	0,982	0,92	0,97	0,95	0,972	0,968	0,954	0,948	0,96	0,948	0,962	0,966	0,964	0,964	0,964	0,964	0,952	0,946	
SWRV6		0,962	0,972	0,974	0,948	0,958 ID		0,948	0,948	0,95	0,948	0,974	0,964	0,97	0,968	0,968	0,978	0,904	0,96	0,934	0,96	0,922	0,974	0,948	0,97	0,962	0,95	0,952	0,976	0,952	0,996	0,98	0,982	0,982	0,982	0,982	0,982	0,95	0,948
SWRV1		0,94	0,952	0,952	0,984	0,946	0,948 ID		1	0,99	0,932	0,95	0,944	0,944	0,952	0,952	0,952	0,88	0,944	0,936	0,948	0,9	0,946	0,992	0,946	0,94	0,956	0,99	0,956	0,99	0,952	0,96	0,954	0,954	0,954	0,954	0,99	1	
SWRV2		0,94	0,952	0,952	0,984	0,946	0,948	1 ID		0,99	0,932	0,95	0,944	0,944	0,952	0,952	0,952	0,88	0,944	0,936	0,948	0,9	0,946	0,992	0,946	0,94	0,956	0,99	0,956	0,99	0,952	0,96	0,954	0,954	0,954	0,954	0,99	1	
SWRV3		0,946	0,958	0,958	0,982	0,952	0,95	0,99	0,99 ID		0,938	0,956	0,95	0,95	0,958	0,954	0,958	0,886	0,95	0,942	0,954	0,904	0,952	0,994	0,952	0,946	0,962	0,988	0,962	0,988	0,954	0,962	0,956	0,956	0,956	0,956	1	0,99	
CMP45		0,966	0,954	0,958	0,934	0,948	0,948	0,932	0,932	0,938 ID		0,96	0,95	0,954	0,958	0,954	0,95	0,896	0,946	0,912	0,954	0,906	0,956	0,936	0,96	0,952	0,938	0,934	0,958	0,934	0,952	0,956	0,954	0,954	0,954	0,954	0,938	0,932	
ba13619		0,976	0,97	0,988	0,954	0,972	0,974	0,95	0,95	0,956	0,96 ID		0,99	0,976	0,982	0,974	0,976	0,91	0,986	0,946	0,974	0,924	0,974	0,954	0,98	0,988	0,958	0,954	0,974	0,954	0,978	0,976	0,976	0,976	0,976	0,956	0,95		
rj1609		0,966	0,96	0,978	0,948	0,966	0,964	0,944	0,944	0,95	0,95	0,99 ID		0,966	0,972	0,964	0,97	0,91	0,996	0,944	0,964	0,924	0,968	0,948	0,97	0,992	0,956	0,948	0,964	0,948	0,968	0,966	0,966	0,966	0,966	0,966	0,95	0,944	
BE2001		0,98	0,97	0,984	0,966	0,97	0,944	0,944	0,95	0,954	0,976	0,966 ID		0,972	0,968	0,968	0,898	0,962	0,934	0,972	0,916	0,964	0,948	0,97	0,968	0,952	0,95	0,974	0,95	0,974	0,972	0,974	0,974	0,974	0,974	0,95	0,944		
RU172		0,976	0,97	0,984	0,956	0,972	0,968	0,952	0,952	0,958	0,958	0,982	0,972	0,972 ID		0,976	0,974	0,904	0,968	0,938	0,972	0,922	0,972	0,956	0,978	0,97	0,96	0,954	0,974	0,954	0,972	0,976	0,974	0,974	0,974	0,974	0,958	0,952	
F8P4		0,964	0,966	0,976	0,956	0,966	0,968	0,952	0,952	0,954	0,954	0,974	0,964	0,968	0,976 ID		0,97	0,902	0,96	0,938	0,964	0,92	0,968	0,952	0,97	0,962	0,956	0,95	0,97	0,95	0,968	0,972	0,974	0,974	0,974	0,974	0,954	0,952	
PRG921		0,964	0,974	0,976	0,956	0,964	0,978	0,952	0,952	0,958	0,95	0,976	0,97	0,968	0,974	0,97 ID		0,904	0,966	0,936	0,962	0,922	0,972	0,956	0,972	0,968	0,964	0,956	0,978	0,956	0,982	0,978	0,976	0,976	0,976	0,976	0,958	0,952	
A131		0,902	0,892	0,908	0,888	0,902	0,904	0,88	0,88	0,886	0,896	0,91	0,91	0,898	0,904	0,902	0,904 ID		0,908	0,868	0,896	0,976	0,928	0,884	0,906	0,91	0,89	0,886	0,896	0,886	0,906	0,906	0,906	0,906	0,906	0,906	0,886	0,88	
b3458		0,962	0,956	0,974	0,944	0,962	0,96	0,944	0,944	0,95	0,946	0,986	0,996	0,962	0,968	0,96	0,966	0,908 ID		0,94	0,96	0,922	0,964	0,948	0,966	0,988	0,952	0,944	0,96	0,944	0,964	0,964	0,962	0,962	0,962	0,95	0,944		
IAL28		0,928	0,93	0,944	0,936	0,928	0,934	0,936	0,936	0,942	0,912	0,946	0,944	0,934	0,938	0,938	0,936	0,868	0,94 ID		0,934	0,886	0,93	0,94	0,932	0,944	0,946	0,94	0,934	0,94	0,938	0,942	0,94	0,94	0,94	0,94	0,942	0,936	
EC2184		0,972	0,962	0,98	0,952	0,982	0,96	0,948	0,948	0,954	0,954	0,974	0,964	0,972	0,972	0,964	0,962	0,896	0,96	0,934 ID		0,914	0,964	0,952	0,97	0,97	0,952	0,95	0,962	0,95	0,964	0,968	0,966	0,966	0,966	0,966	0,954	0,948	
A253		0,916	0,91	0,926	0,902	0,92	0,922	0,9	0,9	0,904	0,906	0,924	0,924	0,916	0,922	0,92	0,922	0,976	0,922	0,886	0,914 ID		0,946	0,902	0,924	0,924	0,908	0,904	0,914	0,904	0,924	0,926	0,926	0,926	0,926	0,926	0,904	0,9	
OSU		0,964	0,96	0,976	0,95	0,97	0,974	0,946	0,946	0,952	0,956	0,974	0,968	0,964	0,972	0,968	0,972	0,928	0,964	0,93	0,964	0,946 ID		0,95	0,974	0,966	0,956	0,952	0,964	0,952	0,974	0,974	0,972	0,972	0,972	0,972	0,952	0,946	
Arg4671		0,944	0,956	0,956	0,984	0,95	0,948	0,992	0,992	0,994	0,936	0,954	0,948	0,948	0,956	0,952	0,956	0,884	0,948	0,94	0,952	0,902	0,95 ID		0,95	0,944	0,96	0,99	0,96	0,99	0,952	0,962	0,958	0,958	0,958	0,958	0,994	0,992	
Gottfr1e		0,972	0,968	0,982	0,95	0,972	0,97	0,946	0,946	0,952	0,96	0,98	0,97	0,97	0,978	0,97	0,972	0,906	0,966	0,932	0,97	0,924	0,974	0,95 ID		0,968	0,958	0,952	0,972	0,952	0,974	0,978	0,976	0,976	0,976	0,952	0,946		
Arg7500		0,968	0,958	0,98	0,944	0,968	0,962	0,94	0,94	0,946	0,952	0,988	0,992	0,968	0,97	0,962	0,968	0,91	0,988	0,944	0,97	0,924	0,966	0,944	0,968 ID		0,952	0,944	0,962	0,944	0,966	0,966	0,964	0,964	0,964	0,964	0,946	0,94	
Arg4605		0,948	0,952	0,964	0,956	0,954	0,95	0,956	0,956	0,962	0,938	0,958	0,956	0,952	0,96	0,956	0,964	0,89	0,952	0,946	0,952	0,908	0,956	0,96	0,958	0,952 ID		0,958	0,956	0,958	0,954	0,962	0,956	0,956	0,956	0,962	0,956		
ROTA01		0,946	0,958	0,958	0,982	0,948	0,952	0,99	0,99	0,988	0,934	0,954	0,948	0,95	0,954	0,95	0,956	0,886	0,944	0,94	0,95	0,904	0,952	0,99	0,952	0,944	0,958 ID		0,962	1	0,956	0,958	0,952	0,952	0,952	0,952	0,988	0,99	
ROTA06		0,966	0,996	0,978	0,96	0,96	0,976	0,956	0,956	0,962	0,958	0,974	0,964	0,974	0,974	0,97	0,978	0,896	0,96	0,934	0,962	0,914	0,964	0,96	0,972	0,962	0,956	0,962 ID		0,962	0,98	0,978	0,98	0,98	0,98	0,98	0,962	0,956	
ROTA07		0,946	0,958	0,958	0,982	0,948	0,952	0,99	0,99	0,988	0,934	0,954	0,948	0,95	0,954	0,95	0,956	0,886	0,944	0,94	0,95	0,904	0,952	0,99	0,952	0,944	0,958	1	0,962 ID		0,956	0,958	0,952	0,952	0,952	0,952	0,988	0,99	
ROTA08		0,966	0,976	0,978	0,952	0,962	0,996	0,952	0,952	0,954	0,952	0,978	0,968	0,974	0,972	0,968	0,982	0,906	0,964	0,938	0,964	0,924	0,974	0,952	0,974	0,966	0,954	0,956	0,98	0,956 ID		0,984	0,986	0,986	0,986	0,986	0,954	0,952	
ROTA09		0,968	0,974	0,98	0,96	0,966	0,98	0,96	0,962	0,956	0,978	0,968	0,972	0,976	0,972	0,978	0,906	0,964	0,942	0,968	0,926	0,974	0,962	0,978	0,966	0,962	0,958	0,978	0,958	0,984 ID		0,992	0,992	0,992	0,992	0,992	0,962	0,96	
ROTA10		0,966	0,976	0,978	0,954	0,964	0,982	0,954	0,954	0,956	0,954	0,976	0,966	0,974	0,974	0,974	0,976	0,906	0,962	0,94	0,966	0,926	0,972	0,958															