

DIVERSIDADE INTRA-GENOTÍPICA DE AMOSTRAS DE ROTAVÍRUS SUÍNAS CIRCULANTES NO ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL¹

(INTRAGENOTYPIC DIVERSITY OF PORCINE ROTAVIRUS STRAINS CIRCULATING IN SÃO PAULO STATE, BRAZIL)

F. GREGORI^{1*}, P. E. BRANDÃO¹, J. A. JEREZ¹

RESUMO

Com o objetivo de se determinar a diversidade intra-genotípica de rotavírus circulantes em criações de suínos de diferentes municípios localizados no Estado de São Paulo, Brasil, um total de 3 amostras de rotavírus pertencentes ao genótipo G[5] foram submetidas ao sequenciamento parcial do gene codificador da proteína VP7. Analogamente, outras 4 amostras P[6], tiveram o gene codificador da proteína VP4 parcialmente definidas. A identidade nucleotídica entre as amostras G[5] variou de 93,1% a 99,4%, e em termos de aminoácidos de 97,5% a 100%. Quanto ao genótipo P[6] as amostras variaram de 93% a 98,7% e 95 a 100% para as identidades de nucleotídeos e aminoácidos, respectivamente. Adicionalmente, inferências filogenéticas feitas a partir de aminoácidos, usando o critério de distância com algoritmo Neighbor-Joining e correção de Poisson como modelo de substituição, demonstraram que as amostras G[5] aqui definidas agruparam-se exclusivamente com amostras homólogas descritas previamente em suínos, enquanto que as P[6] demonstraram relacionamento tanto com amostras humanas e suínas. Em face destes achados, pode-se concluir que há uma heterogeneidade de amostras suínas de rotavírus circulantes nos rebanhos suínos do Estado de São Paulo pertencentes a um mesmo genótipo.

PALAVRAS-CHAVE: Suínos. Rotavírus. Genótipos.

SUMMARY

In order to determine the intragenotypic diversity of rotaviruses circulating in pig farms located in different municipalities in São Paulo, Brazil, a total of three G[5] rotavirus samples were subjected to partial sequencing of the VP7-encoding gene. Similarly, another four P[6] samples had their VP4-encoding gene partially defined. The nucleotide identity among G[5] samples ranged from 93.1% to 99.4%, and in terms of amino acids, 97.5% to 100%. Regarding genotype P[6] samples varied among 93% to 98.7% and 95 to 100% for nucleotide and amino acids identities, respectively. Besides, the amino acid-based phylogeny using Neighbor-Joining distance algorithm and Poisson correction as substitution model, demonstrated that samples G[5] defined herein grouped exclusively with homologous strains previously described in pigs while the P[6] demonstrated a relationship both with human and porcine rotavirus. In face of these findings, one may conclude that there is heterogeneity of porcine rotavirus strains circulating in pig herds in the State of São Paulo belonging to the same genotype.

KEY-WORDS: Swine. Rotavirus. Genotypes.

¹ Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo (USP). Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva 87, São Paulo – SP, Brazil. CEP 05508-270.

*Autor para correspondência: fabiogregori@gmail.com

INTRODUÇÃO

Os rotavírus suínos são uma das principais causas de diarreia nas criações, ocorrendo enzooticamente e acometendo principalmente animais jovens (WIELER et al., 2001; KATSUDA et al., 2006). Este vírus pertence à família *Reoviridae*, gênero *Rotavirus*, e tem como característica um genoma consistindo de 11 fragmentos de RNA de fita dupla, envolto por uma tripla camada proteica, no qual o *core* é formado pelas proteínas VP1, VP2 e VP3, a intermediária pela VP6, que por sua vez também serve como base para classificação em grupos (A a G), e a externa, pela VP4 e VP7, cujos respectivos genes são marcadores (do grupo A) para os genótipos P e G (RAMIG et al., 2005; ESTES & KAPIKIAN, 2007).

Em suínos, rotavírus do grupo A têm sido descritos mais frequentemente pertencendo ao genótipos G[3], G[4] ou G[5] associado com P[6] ou P[7] (CHAN-IT et al., 2008; GREGORI et al., 2009). Estes vírus possuem algumas características que aumentam sua variabilidade genética, incluindo um grande número de partículas excretadas durante a infecção, ampla diversidade de espécies suscetíveis, resistência às condições ambientais e a possibilidade de infecções simultâneas de diferentes sorotipos num mesmo indivíduo (GOUVEA & BRANTLY 1995; JAIN et al., 2001; KOOPMANS & DUIZER, 2004; ESTES & KAPIKIAN, 2007; COLLINS et al., 2010). Além disso, os mecanismos pelos quais emergem amostras de rotavírus envolvem mutações pontuais (drifts), reestruturações, rearranjos (TANIGUCHI & URASAWA, 1995) e recombinações intragênicas (PARRA et al., 2004).

Diferenças genéticas dentro de um mesmo genótipo já foram demonstradas (MATTHIJNSSENS et al., 2008) incluindo os genes VP4 e VP7 (ARISTA et al., 2005; COLLINS et al., 2010; LAMHOUEB et al., 2010), que podem trazer implicações em termos de transmissão zoonótica (MARTELLA et al., 2010), seleção de amostras vacinais e o aprimoramento de métodos diagnósticos (ARISTA et al., 2005; KERIN et al., 2007).

O objetivo deste estudo foi o de determinar a diversidade intragenotípica de rotavírus circulantes em criações de suínos localizadas em diferentes municípios do Estado de São Paulo, Brasil, baseada no sequenciamento parcial dos genes codificadores da VP4 e VP7, dada a restrita disponibilidade de dados acerca de amostras brasileiras.

MATERIAL E MÉTODOS

Um total de 7 amostras fecais diarreicas foram colhidas entre os anos de 1999 a 2001 a partir de diferentes criações comerciais localizadas em seis municípios do Estado de São Paulo, Brasil, foram triadas como positivas para rotavírus por Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (PAGE) (HERRING et al., 1982) e ELISA policlonal “duplo-sanduíche” (GREGORI et al., 2000).

A partir de uma suspensão fecal a 50% (v/v) em TRIS-HCl 0,1 M pH 7,3, centrifugada a 12.000 g por 30 minutos, o RNA total foi extraído com o reagente TRIzol™ (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante.

A genotipagem G e P foi realizada através de *nested multiplex* RT-PCR (GOUVEA et al., 1994a,b). De modo a se evitar contaminação por carreamento de DNA, cada etapa das reações foi realizada em salas separadas. A amostra de rotavírus NCDV foi usada como controle positivo e água ultrapura como negativo.

Os produtos obtidos de diferentes reações de RT-PCR, 780 pb para o genótipo G[5] e 423 pb para P[6], foram purificados diretamente dos géis de agarose, usando o *kit* Concert (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), e submetido a sequenciamento de DNA bi-direcional com BigDye 3.1 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante e sem clonagem prévia. As sequências foram definidas em equipamento ABI-310 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) e enviadas ao GenBank (Tabela 1).

Tabela 1 - Lista das amostras de rotavírus sequenciadas, de acordo com o seu código de identificação, número de acesso, genótipo e origem geográfica.

Identificação	Número de Acesso	Genótipo	Município / Estado
JJ4	DQ473526	G[-] ^a P[6]	Itaberá / SP
JJ6	DQ473528	G[-] P[6]	Piedade / SP
JJ7	DQ473529	G[-] P[6]	Capivari / SP
JJ8	DQ473530	G[-] P[6]	Bragança Paulista / SP
JJ10	DQ473532	G[5] P[-]	Ibiúna / SP
JJ12	DQ473534	G[5] P[-]	Itú / SP
JJ13	DQ473535	G[5] P[-]	Itú / SP

^a [-] = genótipo indefinido.

As respectivas sequências de nucleotídeos G[5] e P[6] bem como as sequências de aminoácidos traduzidas a partir delas, foram alinhadas reciprocamente e com outras homólogas recuperadas do GenBank, através do programa Clustal W 1.83 (THOMPSON et al., 1994), usando (número de acesso/nome da amostra/hospedeiro): a) Genotipo G[5]: X04613/OSU/suíno; DQ813658/344-04-1/suíno; DQ062572/134-04-15/suíno; DQ515961/CMP178/suíno; L35054/A46/suíno; L35059/A34/suíno; L35058/C134/suíno; L35056/CC117/suíno; AY538665/JL94/suíno; DQ857956/RJ40644-90/humano; DQ857955/RJ35400-87/humano; EF672588/IAL28/humano; b) Genotipo P[6]: AY955309/221-04-21/suíno; AY955302/221-04-13/suíno; AY955301/134-04-8/suíno; AY955300/134-04-11/suíno; AB176685/JP3-6/suíno; AY955304/51-02/suíno; M33516/GOTTFRIED/suíno; L20877/M37/humano.

Rotavírus suínos do grupo C com números de acesso M61101 e M74218, foram adicionalmente incluídos como grupo externo para a análise filogenética dos genótipos G[5] e P[6], respectivamente.

Os valores de similaridade entre as sequências nucleotídicas e de aminoácidos foram obtidos com o programa BioEdit v. 7.0.5.3 (HALL, 1999). A inferência filogenética baseada em aminoácidos foi realizada empregando-se o critério de distância, com o método de Neighbor-Joining e Correção de Poisson como modelo de substituição, com 1.000 replicatas de bootstrap, através do programa MEGA 4 (TAMURA et al., 2007).

RESULTADOS

Das sete amostras testadas, foi possível definir o genótipo P[6] (423 pb) em quatro delas enquanto que para o genótipo G[5] (780 pb) somente 3 amostras foram caracterizadas. Estes dados estão apresentados na Tabela 1 de acordo com o seu código de identificação, número de acesso, genótipo e origem geográfica.

Os intervalos dos valores de identidade das sequências de nucleotídeos e aminoácidos entre as amostras geradas neste estudo e comparadas com outras homólogas selecionadas do GenBank, estão apresentados na Tabela 2.

O alinhamento das sequências de aminoácidos correspondente aos resíduos 92-212 (de acordo com a amostra OSU X04613) a partir da tradução do gene codificador da VP7 está apresentado na Figura 1.

A árvore filogenética baseada em aminoácidos traduzidos a partir de um fragmento do gene codificador da VP7 dos rotavírus está apresentada na Figura 2, demonstrando um cluster entre as amostras definidas neste estudo (indicadas com flechas) e outros rotavírus suínos (A46, A34, OSU e JL94). Números próximos aos nós são os valores de bootstrap obtidos com 1.000 replicatas e a escala representa o número de substituições por sítio.

O alinhamento das sequências de aminoácidos correspondente aos resíduos 184-264 (de acordo com a amostra Gottfried M33516) traduzidas a partir do gene codificador da proteína VP4, está apresentado na Figura 3.

A árvore filogenética baseada em aminoácidos a partir de um fragmento traduzido do gene codificador da proteína VP4 está apresentada na Figura 4, na qual as amostras suínas brasileiras JJ6, JJ7 e JJ8 (indicadas com flechas) segregaram-se num cluster, enquanto que a amostra JJ4 agrupou-se com a amostra homóloga 51/02.

DISCUSSÃO

Ambas proteínas VP7 e VP4 (no que diz respeito aos seus sub-produtos de clivagem VP8* e VP5*) interagem com a membrana das células hospedeiras (CARTER & SAUNDERS, 2007) e estão independentemente envolvidas com a indução de anticorpos neutralizantes (ESTES & KAPIKIAN, 2007). Desta forma, elas são um parâmetro para a seleção de estirpes vacinais (KIRKWOOD, 2010) e a variação intragenotípica pode ser uma possível explicação não só para falhas vacinais mas também de uma melhor capacidade de transmissão interespecies.

Tabela 2- Intervalo dos valores de identidade nucleotídica e de aminoácidos a partir de sequências parciais da VP7 (genótipo G[5]) e VP4 (genótipo P[6]) de rotavírus.

Genótipo	Identidade	Nucleotídeos (mín-máx)	Aminoácido (mín-máx)
G[5]	Entre as sequências geradas neste estudo	93,1% - 99,4%	97,5% - 100%
	Entre as sequências geradas neste estudo comparadas com outras recuperadas do Genbank	83,7% - 95%	91,7% - 100%
P[6]	Entre as sequências geradas neste estudo	93% - 98,7%	95% - 100%
	Entre as sequências geradas neste estudo comparadas com outras recuperadas do Genbank	83,5% - 93,4%	86,4% - 98,7%

nucleotídeos (83,7%) ocorreu entre as amostras CMP178 e JJ13.

Considerando a região sequenciada, não é possível concluir que as amostras suínas brasileiras constituam uma sub-linhagem, embora estudos prévios já tenham demonstrado divergência dos genes codificadores da VP7 de outros genótipos ao se comparar, por exemplo, aqueles pertencendo ao G4 em humanos e suínos (ARISTA et al., 2005; COLLINS et al., 2010). Com relação ao G5, Silva et al. (2011) definiram três diferentes linhagens, onde em duas delas coexistem amostras humanas e suínas. De fato, tal como consta na Figura 1, rotavírus humanos G[5] previamente descritos no Brasil, apresentaram um maior polimorfismo quando comparado aos suínos, especialmente as substituições D5T, D9E e I55G/E/V/A.

Estes achados estão de acordo com a topologia da árvore G[5] (Figura 2) na qual as amostras brasileiras JJ10 e JJ12 agruparam-se com a A46, devido a ausência de polimorfismos no fragmento sequenciado, resultando numa politomia. Por outro lado, os dados de sequenciamento demonstraram relação entre as amostras JJ13, JL94 e OSU, enquanto que a topologia da árvore denota uma maior distância entre as amostras suínas e aquelas isoladas de humanos, que por sua vez formaram um grupo separado (Figura 2).

Considerando o genótipo P[6], a região sequenciada do gene codificador da proteína VP4 (resíduos de aminoácidos 184-264) compreende principalmente o produto de clivagem VP8* (MATTION et al., 1994). Os valores de identidade de aminoácidos variaram de 95% a 100% (Tabela 2), com valor máximo apresentado entre amostras dos municípios de Piedade (JJ6) e Bragança Paulista (JJ8), geograficamente distantes entre si em torno de 170 km. Estas amostras também diferiram por uma única substituição de aminoácidos (H61Y) da amostra JJ7 (Figura 3), também refletida pela topologia da árvore (Figura 4). A amostra JJ4 manteve um maior relacionamento filogenético com a amostra suína 51/02, previamente descrita na Espanha. As substituições de aminoácidos encontradas entre as amostras sequenciadas neste estudo são V13I, V49I, Y61H e R62Q.

Martella et al. (2006) através da análise da VP8* observaram que os rotavírus suínos podem ser caracterizados em diferentes linhagens dentro do mesmo genótipo P[6], mas observaram um maior grau de similaridade nucleotídica e de aminoácidos com a amostra protótipo humana M37 (linhagem I) do que com a amostra suína Gottfried (linhagem II), sugerindo um forte relacionamento na evolução dos rotavírus animais e humanos. A topologia da árvore, mostrada na Figura 4, está de acordo com este fato, uma vez que as amostras suínas JJ4, JJ6, JJ7 e JJ8 apresentaram relacionamento próximo com a M37, embora a região hipervariável B, localizada entre os resíduos 92 a 192, não tenha sido incluída na análise. Espera-se que os genes codificadores da VP4 e VP7 tenham diferentes níveis de conservação nucleotídica uma vez que eles são alvo de anticorpos neutralizantes (TANIGUSHI & URASAWA, 1995), e nesse sentido a comparação da patogenicidade e virulência causadas por substituições

de aminoácidos é necessária para uma compreensão mais ampla das infecções causadas por rotavírus bem como para a predição da eficiência de imunógenos. Além disso, não foi possível caracterizar simultaneamente os genótipos G e P das amostras estudadas, o que pode ser atribuído a variabilidade nos sítios de reconhecimento dos primers (KERIN et al., 2007; COLLINS et al., 2010) tornando necessária uma constante revisão ou atualização destes oligonucleotídeos assim que novas sequências tornem-se disponíveis.

Apesar de que regiões parciais dos genes codificadores da VP4 e VP7 tenham sido levadas em consideração e o tamanho da amostra relativamente pequeno, é possível concluir que há uma mistura de rotavírus suínos pertencentes a um mesmo genótipo circulantes nos rebanhos do Estado de São Paulo, Brasil.

AGRADECIMENTOS

Ao Sr. Alexandre Abelardo Sanches pelo auxílio técnico e FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo apoio financeiro (Proc.99/05912-9).

REFERÊNCIAS

- ARISTA, S.; GIAMMANCO, G. M.; DE GRAZIA, S.; COLOMBA, C.; MARTELLA, V. Genetic variability among serotype G4 Italian human rotaviruses. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, p.1420-1425, 2005.
- CARTER, J. B.; SAUNDERS, V. A. **Virology: Principles and applications**. West Sussex: John Wiley and Sons Ltd, 2007, p.147-156.
- CHAN-IT, W.; KHAMRIN, P.; SAEKHOW, P.; PANTIP, C.; THONGPRACHUM, A.; PEERAKOME, S.; USHIJIMA, H.; MANEEKARN, N. Multiple combinations of P[13]-like genotype with G3, G4, and G5 in porcine rotaviruses. **Journal of Clinical Microbiology**, v.46, p.1169-1173, 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.
- ESTES, M.K.; COHEN, J. Rotavirus gene structure and function. **Microbiological Reviews**, v.53, p.410-449, 1989.
- ESTES, M. K.; KAPIKIAN, A. Z. Rotaviruses. In: KNIPE D. M.; HOWLEY P.M. (Eds.). **Fields Virology**. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2007, p.1918-1976.

- GOUVEA, V.; BRANTLY, M. Is rotavirus a population of reassortants? **Trends in Microbiology**, v.3, p.159-162, 1995.
- GOUVEA, V.; SANTOS, N.; TIMENETSKY, M. C. Identification of bovine and porcine rotavirus G types by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.32, p.1338-1340, 1994a.
- GOUVEA, V.; SANTOS, N.; TIMENETSKY, M. C. VP4 typing of bovine and porcine group A rotaviruses by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.32, p.1333-1337, 1994b.
- GREGORI, F.; BRANDÃO, P. E.; ROSALES, C. A. R.; CORTEZ, A.; HEINEMANN, M. B.; RICHTZENHAIN, L.; JEREZ, J. A. Desenvolvimento de um método de ELISA para a detecção de rotavírus a partir de material fecal. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.67, p.191-194, 2000.
- GREGORI, F.; ROSALES, C. A. R.; BRANDÃO, P. E.; SOARES, R. M.; JEREZ, J. A. Diversidade genotípica de rotavírus suínos no Estado de São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.29, p.707-712, 2009.
- HALL, T. A. Bioedit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/nt. **Nucleic Acids Symposium Series**, p.41, p.95-98, 1999.
- HERRING, A. J.; INGLIS, N. F.; OJEH, C. K.; SNODGRASS, D. R.; MENZIES, J. D. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. **Journal of Clinical Microbiology**, v.16, p.473-477, 1982.
- JAIN, V.; DAS, B. K.; BHAN, M. K.; GLASS, R. I.; GENTSCH, J. R.; INDIAN STRAIN SURVEILLANCE COLLABORATING LABORATORIES. Great diversity of group A rotavirus strains and high prevalence of mixed rotavirus infections in India. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, p.3524-3529, 2001.
- 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.
- KERIN, T. K.; KANE, E. M.; GLASS, R. I.; GENTSCH, J. R. Characterization of VP6 genes from rotavirus strains collected in the United States from 1996-2002. **Virus Genes**, v.35, p.489-495, 2007.
- KIRKWOOD, C. D. Genetic and antigenic diversity of human rotaviruses: Potential impact on vaccination programs. **The Journal of Infectious Diseases**, v.202, p.S43-S48, 2010.
- KOOPMANS, M.; DUIZER, E. Foodborne viruses: an emerging problem. **International Journal of Food Microbiology**, v.90, p.23-41, 2004.
- LAMHOUEB, S.; COOK, A.; POLLARI, F.; BIDAWID, S.; FARBER, J.; MATTISON, K. Rotaviruses from Canadian farm samples. **Archives of Virology**, v.155, p.1127-1137, 2010.
- 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, p.509-519, 2006.
- MARTELLA, V.; BÁNYAI, K.; MATTHIJNSSENS, J.; BUONAVOGLIA, C.; CIARLET, M. Zoonotic aspects of rotaviruses. **Veterinary Microbiology**, v.140, p.246-255, 2010.
- MATTHIJNSSENS, J.; CIARLET, M.; HEIMAN, E.; ARIJS, I.; DELBEKE, T.; MCDONALD, S. M.; PALOMBO, E. A.; ITURRIZA-GÓMARA, M.; MAES, P.; PATTON, J. T.; RAHMAN, M.; 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 Virology**, v.82, p.3204-3219, 2008.
- MATTION, N. M.; COHEN, J.; ESTES, M. K. The rotavirus proteins. In: KAPIKIAN, A. Z. (Ed.). *Viral Infections of the Gastrointestinal Tract*. 2 ed. New York: Marcel-Dekker Inc., 1994, p.169-249.
- 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, p.1713-1716, 2004.
- RAMIG, F.; CIARLET, M.; MERTENS, P. P. C.; DERMODY, T. S. Rotavirus. In: FAUQUET, C. M.; MAYO, M. A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L.A. **Virus taxonomy: eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. Amsterdam: Elsevier, 2005, p. 484-496.
- SILVA, M. F.; TORT, L. F.; GOMÉZ, M. M.; ASSIS, R. M.; VOLOTÃO, E. M.; MENDONÇA, M. C.; BELLO, G.; LEITE, J. P. 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, 2011.
- TAMURA K.; DUDLEY J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v.24, p.1596-1599, 2007.

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

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON T. J. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v.22, p.4673-4680, 1994.

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