



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE
PÚBLICA**

TÂMERA NUNES VIEIRA ALMEIDA

**Caracterização epidemiológica e genômica de amostras de
rotavírus humano espécie A em Goiânia-Goiás**

**Goiânia
2016**



UFG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

Dissertação Tese Outro*: _____

*No caso de mestrado/doutorado profissional, indique o formato do Trabalho de Conclusão de Curso, permitido no documento de área, correspondente ao programa de pós-graduação, orientado pela legislação vigente da CAPES.

Exemplos: Estudo de caso ou Revisão sistemática ou outros formatos.

2. Nome completo do autor

TÂMERA NUNES VIEIRA ALMEIDA

3. Título do trabalho

Caracterização epidemiológica e genômica de amostras de rotavírus humano espécie A em Goiânia-Goiás

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

a) consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);

b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.

O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por **Divina Das Dores De Paula Cardoso, Usuário Externo**, em 28/08/2024, às 11:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Tâmera Nunes Vieira Almeida, Usuário Externo**, em 28/08/2024, às 13:40, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4772549** e o código CRC **80A7E874**.

TÂMERA NUNES VIEIRA ALMEIDA

Caracterização epidemiológica e genômica de amostras de rotavírus humano espécie A em Goiânia-Goiás

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública, do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, da Universidade Federal de Goiás como requisito para obtenção do título de Doutor em Medicina Tropical e Saúde Pública.

Área de concentração: Microbiologia

Linha de pesquisa: Bioquímica, Biologia Molecular e Celular de Agentes Infecciosos e Parasitários

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Divina das Dôres de Paula Cardoso

**Goiânia
2016**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Almeida, Tâmera Nunes Vieira
Caracterização epidemiológica e genômica de amostras de rotavírus humano espécie A em Goiânia-Goiás [manuscrito] / Tâmera Nunes Vieira Almeida. - 2016.
110 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Divina das Dôres de Paula Cardoso.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Programa de Pós Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública, Goiânia, 2016.
Bibliografia. Anexos. Apêndice.
Inclui siglas, abreviaturas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Rotavírus humano espécie A. I. Cardoso, Divina das Dôres de Paula, orient. II. Título.

CDU 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
 INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA
 PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA
 Rua 235, s/n - Sotor Universitário - Goiânia/GO - CEP: 74.605-050
 Fones: (62) 3209.6362 - 3209.6102 - Fax: (62) 3209.6363 - e-mail: ppgintrop.ufg@gmail.com

ATA DA REUNIÃO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE TÂMERA NUNES VIEIRA ALMEIDA - Aos vinte e dois dias do mês de setembro do ano de 2016 (22/09/2016), às 9:00 horas, reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Profas. Dras. DIVINA DAS DORES DE PAULA CARDOSO, CÉLIA MARIA DE ALMEIDA SOARES, JOANA D'ARC PEREIRA MASCARENHAS, MARIANA PIRES DE CAMPOS TELLES e REGINA MARIA BRINGEL MARTINS, para, sob a presidência da primeira, e em sessão pública realizada no INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA, procederem à avaliação da defesa de tese intitulada: **"CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE AMOSTRAS DE ROTAVÍRUS ESPÉCIE A OBTIDAS ANTES E APÓS A IMPLANTAÇÃO DE VACINAS EM GOIÂNIA-GOÍÁS"** em nível de DOUTORADO, área de concentração em MICROBIOLOGIA, de autoria de TÂMERA NUNES VIEIRA ALMEIDA, discente do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA, da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pela Orientadora Profa. Dra. DIVINA DAS DORES DE PAULA CARDOSO, que fez a apresentação formal dos membros da Banca e orientou a Candidata sobre como utilizar o tempo durante a apresentação de seu trabalho. A palavra a seguir, foi concedida ao autor da tese que, em 30 minutos procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da Banca arguiu a Candidata, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da defesa. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº. 1034/2014 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública a Banca, em sessão secreta, expressou seu Julgamento, considerando a candidata **Aprovada** ou **Reprovada**:

Banca Examinadora

- Dra. Divina das Dores de Paula Cardoso
- Dra. Célia Maria de Almeida Soares
- Dra. Joana D'Arc Pereira Mascarenhas
- Dra. Mariana Pires de Campos Telles
- Dra. Regina Maria Bringel Martins

Aprovada / Reprovada

APROVADA
APROVADA
APROVADA
APROVADA
APROVADA

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou a candidata HABILITADA (Habilitada ou não Habilitada), cumprindo todos os requisitos para fins de obtenção do título de DOUTOR EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA, na área de concentração em MICROBIOLOGIA, pela Universidade Federal de Goiás. Cumpridas as formalidades de pauta, às 12h 05min, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de tese e para constar eu, KARINY VIEIRA SOARES E SILVA, secretária do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública lavrei a presente Ata que depois de lida e aprovada, será assinada pelos membros da Banca Examinadora e por mim em duas vias de igual teor. A Banca Examinadora aprovou a seguinte alteração no título da Tese:

Caracterização Epidemiológica e Genotípica de amostras de Rotavírus Humano Espécie A em Goiânia - Goiás

Dra. Divina das Dores de Paula Cardoso (IPTSP/UFV) Divina das Dores de Paula Cardoso
 Dra. Célia Maria de Almeida Soares (ICB/UFV) Célia Maria de Almeida Soares
 Dra. Joana D'Arc Pereira Mascarenhas (Instituto Evandro Chagas/PA) Joana D'Arc Pereira Mascarenhas
 Dra. Mariana Pires de Campos Telles (ICB/UFV) Mariana Pires de Campos Telles
 Dra. Regina Maria Bringel Martins (IPTSP/UFV) Regina Maria Bringel Martins
 Secretário da Pós-Graduação: Kariny Vieira Soares e Silva

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE
PÚBLICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS**

BANCA EXAMINADORA DE TESE DE DOUTORADO

Aluna: Tâmera Nunes Vieira Almeida

Orientadora: Divina das Dôres de Paula Cardoso

Membros:

1. Profa. Dra. Divina das Dôres de Paula Cardoso
2. Profa. Dra. Joana D'Arc Pereira Mascarenhas
3. Profa. Dra. Mariana Pires de Campos Telles
4. Profa. Dra. Regina Maria Bringel Martins
5. Profa. Dra. Célia Maria de Almeida Soares
6. Prof. Dr. Alexandre Siqueira Guedes Coelho
7. Prof. Dr. Clayton Luiz Borges
8. Profa. Dra. Menira Borges de Lima Dias e Souza
9. Prof. Dr. André Kipnis

Data: 22/09/2016

“Você nasceu no lar que precisava nascer, vestiu o corpo físico que merecia, mora onde melhor Deus te proporcionou, de acordo com o teu adiantamento. Você possui os recursos financeiros coerentes para as tuas lutas terrenas. Seu ambiente de trabalho é o que você elegeu espontaneamente para a sua realização. Teus parentes e amigos são as almas que você mesmo atraiu, com tua própria afinidade. Portanto, teu destino está constantemente sob teu controle. Você escolhe, recolhe, elege, atrai, busca, expulsa, modifica tudo aquilo que te rodeia a existência. Não reclame, nem se faça de vítima. Antes de tudo, analisa e observa. A mudança está em tuas mãos. Reprograma tua meta, busca o bem e você viverá melhor. Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim.”

Chico Xavier

*Ao meu marido Cristiano,
pelo imenso companheirismo
e aos meus queridos filhos, Mikaela e João Pedro,
pela paciência de me esperar.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás (IPTSP/UFG) pela oportunidade.

Aos professores e funcionários, do IPTSP/UFG, sempre prestativos e que contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho.

À professora Divina das Dôres de Paula Cardoso pela oportunidade de continuar minha formação profissional, pela companhia e pelo exemplo de firmeza que desejo seguir.

À professora Mariana Pires de Campos Telles e ao professor Roosevelt Alves da Silva pelo auxílio inestimável nos procedimentos de sequenciamento genômico e modelagem molecular.

Às crianças e seus responsáveis que participaram e permitiram a realização desse estudo.

Aos meus pais, Lauzânio e Giselda, e à minha irmã, Eglia, pelo carinho e incentivo.

Ao meu marido Cristiano e aos meus filhos, Mikaela e João Pedro, pelo carinho, incentivo e compreensão durante minha ausência.

À Jordelina e Regina por me acompanharem também nessa jornada com palavras de carinho.

Aos queridos amigos, Kareem e Teresinha pelo companheirismo e participação nesse estudo.

Às professoras Fabíola e Menira, pelo bom convívio e auxílio no desenvolvimento desse trabalho.

Aos saudosos “meninos” do Laboratório de Virologia Humana, Marielton, Hugo, Ítalo e Victor, hoje homens jovens que já trilham outros caminhos a quem tenho muita estima.

À Nathânia, Anniely, Francielly e Keili, pelo trabalho partilhado e pelas muitas risadas.

Por fim, agradeço a todos que cruzaram meu caminho ao longo da realização desse trabalho e que de alguma forma contribuíram para a concretização dessa tarefa e para o meu crescimento.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Considerações gerais	1
1.2. Classificação taxonômica	2
1.3. Rotavírus A.....	2
1.3.1. Morfologia	2
1.3.2. Genoma.....	4
1.3.3. Proteínas de RVA.....	5
1.3.3.1. Proteínas estruturais	5
1.3.3.2. Proteínas não estruturais	9
1.4. Variabilidade genômica/Antigênica de RVA.....	12
1.5. Replicação de RVA	15
1.6. Evolução de RVA.....	17
1.7. Aspectos clínicos e patogenia de RVA.....	19
1.8. Métodos de estudo de RVA.....	20
1.9. Vacinas para RVA	22
1.10. Epidemiologia de RVA.....	23
2 JUSTIFICATIVA	27
3 OBJETIVOS	29
3.1. Objetivo geral	29
3.2. Objetivos específicos	29
4 MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1. Material de estudo.....	30
4.2. Metodologia.....	30
4.2.1. Preparo das suspensões fecais	30
4.2.2. Detecção de RVA	31
4.2.2.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida	31
4.2.3. Caracterização das amostras positivas para RVA	32
4.2.3.1. Extração do ácido nucleico viral.....	32
4.2.3.2. Genotipagem G (VP7) e P (VP4) por RT-PCR	32
4.2.3.3. Sequenciamento genômico dos 11 segmentos <i>dsRNA</i>	33

4.2.3.4. Análises filogenética e de identidade	34
4.2.3.5. Caracterização de RVA	35
4.2.4. Modelagem molecular	35
4.2.5. Análise estatística	36
5 RESULTADOS	37
5.1. Detecção de RVA	37
5.2. Genotipagem G (VP7) e P (VP4) de amostras positivas para RVA.....	38
5.3. Genotipagem dos 11 segmentos de <i>dsRNA</i> de RVA	38
5.4. Análise filogenética	39
5.5. Análise comparativa de identidade nucleotídica e de aminoácidos.....	39
5.6. Modelagem molecular	41
6 DISCUSSÃO	45
7 CONCLUSÕES.....	51
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53
APÊNDICES.....	83
ANEXOS.....	109

TABELAS, FIGURAS E APÊNDICES

Tabela 1	Positividade para RVA a partir de crianças hospitalizadas em relação à faixa etária, presença ou não de GEA e estação climática – 2014-2015.	37
Tabela 2	Genótipos G (VP7) e P (VP4) de RVA considerando a data da coleta das amostras fecais.	38
Tabela 3	Constelação genotípica das amostras de RVA obtidas nos períodos pré e pós-vacina.	39
Figura 1	Microscopia eletrônica de partículas viral de RVA.	3
Figura 2	Diagrama esquemático da partícula viral de RVA.	3
Figura 3	Representação da estrutura proteica de RVA.	4
Figura 4	Representação da espícula intacta de RVA e dos domínios proteicos.	7
Figura 5	Representação do trímero de VP7 e dos domínios proteicos.	8
Figura 6	Representação do padrão de migração dos segmentos de <i>dsRNA</i> na EGPA.	15
Figura 7	Diagrama esquemático do processo de replicação de RVA.	17
Figura 8	Alinhamento dos resíduos de aminoácidos da proteína VP7 da vacina Rotarix® com as amostras dos períodos pré e pós-vacina.	40
Figura 9	Alinhamento dos resíduos de aminoácidos da proteína VP4 da vacina Rotarix® com as amostras dos períodos pré- e pós-vacina.	41
Figura 10	Estrutura 3D RVA-VP7 (Amostra 3003/2005/G1P[8]).	42
Figura 11	Estrutura 3D RVA-VP7 (Amostra 3088/2006/G1P[8]).	42
Figura 12	Estrutura 3D RVA-VP7 (Amostra 33610/2014/G12P[8]).	43
Figura 13	Estrutura 3D RVA-VP4 (Amostra 3003/2005/G1P[8]).	43
Figura 14	Estrutura 3D RVA-VP4 (Amostra 3088/2006/G1P[8]).	44
Figura 15	Estrutura 3D RVA-VP4 (Amostra 33610/2014/G12P[8]).	44

Apêndice I	Iniciadores utilizados nas reações de PCR para amplificação dos 11 segmentos de RVA.	83
Apêndice II	Condições de ciclagem das reações de PCR para os genes codantes das VPs e NSPs.	84
Apêndice III	<i>Molprobability score</i> para os modelos de VP7 e VP4.	85
Apêndice IV	Árvores filogenéticas dos 11 segmentos de <i>dsRNA</i> .	86
Apêndice V	Identidade de nucleotídeos e aminoácidos das amostras G1P[8], períodos pré e pós-vacina e da amostra G12P[8], período pós-vacina, em comparação a amostra Rotarix e outras depositadas no NCBI.	97
Apêndice VI	Valores de <i>Root Mean Square Deviation</i> (RMSD).	108

SIGLAS E ABREVIATURAS

$\alpha 2\beta 1$	Integrina alfa2beta1
$\alpha 4\beta 1$	Integrina alfa4beta1
$\alpha v\beta 3$	Integrina alfaVbeta3
2'-O-MTase	Ribose-2'-O-metiltransferase
Ca ²⁺	Íon cálcio
c-c	Espiral enrolado (<i>coiled-coil</i>)
cDNA	DNA complementar (<i>complementary DNA</i>)
C-terminal	Carboxiterminal
DLP	Partícula com dupla camada (<i>double-layered particle</i>)
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos
dsRNA	Ácido ribonucleico de fita dupla (<i>double-stranded Ribonucleic Acid</i>)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético (<i>ethylenediamine tetraacetic acid</i>)
EGPA	Eletroforese em gel de poliacrilamida
eIF4G	Fator de iniciação eucariótico de tradução 4 gama (<i>eukaryotic translation initiation factor 4 gamma</i>)
GTase	Guanililtransferase
GTase/RTPase	Guanililtransferase/RNA trifosfatase
HIT	<i>Histidine triad</i>
IFN	Interferon
LVH/IPTSP/UFG	Laboratório de Virologia Humana do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás
MAbs	Anticorpos monoclonais (<i>monoclonal antibodies</i>)
ME	Microscópio eletrônico
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro (<i>messenger ribonucleic acid</i>)
N7-MTase	Guanina-N7-metiltransferase
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>

NSP	Proteína não estrutural (<i>non structural protein</i>)
N-terminal	Aminoterminal
NTPase	Nucleosídeo trifosfatase (<i>nucleoside triphosphatase</i>)
ORF	Quadro de leitura aberta (<i>open reading frame</i>)
PABP	Proteína de ligação a cauda poli (A) (<i>poly (A) binding protein</i>)
PDB	Banco de Informações de Proteínas (<i>Protein Data Bank</i>)
PDE	Fosfodiesterase (<i>phosphodiesterase</i>)
RE	Retículo endoplasmático
RCWG	<i>Rotavirus Classification Working Group</i>
RMSD	Desvio médio quadrático (<i>root-mean-square deviation</i>)
RpRd	RNA-polimerase-RNA-dependente
RTPase	RNA trifosfatase (<i>RNA triphosphatase</i>)
RT-PCR	Reação de transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (<i>reverse transcription polymerase chain reaction</i>)
RT-qPCR	Reação de transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase quantitativa (<i>quantitative reverse transcription polymerase chain reaction</i>)
SDS	Sulfato duodecil sódio
SGs	Subgrupos
ssRNA	RNA de fita simples (<i>single-stranded RNA</i>)
TBE	Tampão Tris/borato/EDTA
TLP	Partícula com tripla camada (<i>triple-layered particle</i>)
UTR	Região não traduzível (<i>untranslated region</i>)
VLPs	Partículas semelhantes a vírus (<i>virus-like particles</i>)
VP	Proteína viral (<i>viral protein</i>)
WHO	Organização Mundial de Saúde (<i>World Health Organization</i>)

RESUMO

Rotavírus A (RVA) é importante agente causador da gastroenterite aguda (GEA), sendo recomendada a vacinação para a prevenção e o controle dessa virose. No Brasil, a partir de 2006, duas vacinas têm sido utilizadas, sendo a Rotarix® incluída no Programa Nacional de Imunização. Desde a sua implantação, tem-se observado redução nos índices de hospitalização e positividade para RVA. Nesse sentido, o presente estudo teve como objetivo a detecção de RVA a partir de amostras de fezes provenientes de crianças com até cinco anos de idade, com ou sem GEA, obtidas no período 2014-2015, além de caracterizar os 11 segmentos genômicos de RVA de amostras obtidas em períodos pré e pós-vacina e compará-los à amostra vacinal. Foram analisadas 341 amostras de fezes, 335 obtidas no período 2014-2015 e seis amostras de arquivo positivas para RVA, sendo uma do período pré-vacina. A detecção de RVA foi feita por eletroforese em gel de poliacrilamida e a genotipagem G (VP7) e P (VP4) por *Multiplex-Nested-PCR*. Os 11 segmentos genômicos foram caracterizados por sequenciamento e a modelagem molecular foi feita para VP7 e VP4. Das 335 amostras de fezes (2014-2015), nove foram positivas para RVA com padrão eletroferotípico longo, sendo quatro caracterizadas como G12P[8]. Das seis amostras arquivo, também padrão longo, cinco eram G1P[8], sendo uma do período pré-vacina. A caracterização dos 11 segmentos genômicos foi possível para três amostras, duas amostras do arquivo (G1P[8]), sendo uma do período pré-vacina e outra (G12P[8]) do período 2014-2015. As três amostras foram caracterizadas como genogrupo I. A análise filogenética possibilitou a diferenciação de linhagens para VP7, VP4, VP6 e NSP4; as amostras G1, dos períodos pré e pós-vacina, foram caracterizadas como linhagens II e I, respectivamente, e G12, como linhagem III e, as amostras P[8] como linhagem III. As amostras I1 (VP6) foram caracterizadas como linhagem IV (pré-vacina) e I (pós-vacina) e, as amostras E1 (NSP4) foram caracterizadas como linhagem III. Foi verificado alta identidade nucleotídica e de aminoácidos para os 11 segmentos genômicos das três amostras em relação à vacina, sendo menor para VP7 e VP4 da amostra G12P[8]. Essa menor identidade foi evidenciada na estrutura proteica, principalmente, nos epítomos antigênicos de ambas as proteínas. Conclui-se que RVA continua a circular com o mesmo genótipo das vacinas e com genótipo diferente, o que reforça a necessidade do contínuo monitoramento do agente no contexto da vacinação.

Palavras-chave: Rotavírus humano espécie A. Caracterização molecular. Vacina.

ABSTRACT

Rotavirus A (RVA) is an important causative agent of acute gastroenteritis (AGE), and vaccination is recommended for the prevention and control of this virus. In Brazil, since 2006, two vaccines have been used, with Rotarix® included in the National Immunization Program. Since its implementation, there has been a reduction in hospitalization rates and positivity for RVA. In this sense, the present study aimed to detect RVA from stool samples from children up to five years of age, with or without GEA, obtained in the period 2014-2015, in addition to characterizing the 11 genomic segments of RVA of samples obtained in pre- and post-vaccine periods and compare them to the vaccine sample. 341 stool samples were analyzed, 335 obtained in the period 2014-2015 and six archival samples positive for RVA, one from the pre-vaccine period. RVA detection was performed by polyacrylamide gel electrophoresis and G (VP7) and P (VP4) genotyping by Multiplex-Nested-PCR. The 11 genomic segments were characterized by sequencing and molecular modeling was done for VP7 and VP4. Of the 335 stool samples (2014-2015), nine were positive for RVA with a long electrophoretic pattern, four of which were characterized as G12P[8]. Of the six archive samples, also a long standard, five were G1P[8], one of which was from the pre-vaccine period. The characterization of the 11 genomic segments was possible for three samples, two archive samples (G1P[8]), one from the pre-vaccine period and the other (G12P[8]) from the 2014-2015 period. The three samples were characterized as genogroup I. Phylogenetic analysis made it possible to differentiate lineages for VP7, VP4, VP6 and NSP4; samples G1, from the pre- and post-vaccine periods, were characterized as lineages II and I, respectively, and G12, as lineage III, and samples P[8] as lineage III. Samples I1 (VP6) were characterized as lineage IV (pre-vaccine) and I (post-vaccine) and samples E1 (NSP4) were characterized as lineage III. High nucleotide and amino acid identity was verified for the 11 genomic segments of the three samples in relation to the vaccine, being lower for VP7 and VP4 of the G12 sample P[8]. This lesser identity was evident in the protein structure, mainly in the antigenic epitopes of both proteins. In conclusion, RVA continues to circulate with the same genotype as the vaccines and with a different genotype, which reinforces the need for continuous monitoring of the agent in the context of vaccination.

Keywords: Human rotavirus species A. Molecular characterization. Vaccine.

1 INTRODUÇÃO

1.1. Considerações gerais

A Organização Mundial de Saúde (*WHO – World Health Organization*) estima que, em todo o mundo, exista aproximadamente 2,2 bilhões de indivíduos entre 0-19 anos de idade, e que muitos desses estejam expostos a riscos em termos das condições ambientais, sanitárias, sociais e econômicas. Presume-se que, a cada ano, aproximadamente três milhões de crianças com até cinco anos de idade morram em razão de doenças associadas às condições ambientais e, que dessas, cerca de 1,5 milhão pereçam à doença diarreica que, em muitos casos, é relacionada à contaminação da água e a condições inadequadas de saneamento (WHO, 2015a).

A diarreia, assim como o vômito e a febre, são sintomas da gastroenterite aguda (GEA), que pode ser causada por diferentes agentes infecciosos, como bactérias, protozoários e vírus. Essa enfermidade acomete indivíduos de todas as idades, sendo as crianças com até cinco anos de idade e idosos as populações mais vulneráveis, principalmente em países em desenvolvimento (O'RYAN et al., 2014; WHO, 2015b).

Diferentes agentes virais são responsabilizados pela GEA e, dentre eles, têm seu papel reconhecido, rotavírus espécie A, norovírus, sapovírus, adenovírus sorotipos 40 e 41 e astrovírus (AMARAL et al., 2015; DESSELBERGER et al., 2014; LA ROSA et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2014; RAMANI, KANG, 2009).

O primeiro relato de rotavírus como patógeno entérico ocorreu em 1963, a partir da observação por imunomicroscopia eletrônica (IME) de partículas virais em tecido intestinal de camundongos com diarreia (ADAMS, KRAFT, 1963). Posteriormente, o agente também foi visualizado e considerado como o causador de gastroenterite em bezerros recém-natos (MEBUS et al., 1969). Em humanos, a associação de rotavírus à GEA infantil ocorreu em 1973, também após a visualização de partículas virais semelhantes às dos outros animais em espécimes clínicos (mucosa duodenal e fezes) provenientes de crianças com diarreia não bacteriana (BISHOP et al., 1973; FLEWETT, BRYDEN, DAVIES, 1973). A princípio o agente foi denominado *reovirus-like*, *orbivirus* ou *duovirus*, mas devido ao seu aspecto de roda ao microscópio eletrônico (ME) foi nomeado rotavírus (*rota* = roda) (ADAMS, KRAFT, 1963).

No Brasil, o primeiro relato da associação de rotavírus a GEA ocorreu em Belém, Pará, em 1976, onde o vírus foi identificado em espécimes clínicos de crianças com GEA (LINHARES et al., 1977). A partir desse estudo pioneiro, sucederam-se numerosas investigações, incluindo as da Região Centro-Oeste, confirmando o papel desempenhado pelo agente na GEA (ALMEIDA et al., 2015; BORGES et al., 2011; CARDOSO et al., 2000; 2001; 2003; COSTA et al., 2004; LUCHS et al., 2016; MUNFORD et al., 2009; SOUZA et al., 2003).

1.2. Classificação taxonômica

Rotavirus é um gênero da família *Reoviridae*, a qual é dividida em duas subfamílias, *Spinareovirinae* e *Sedoreovirinae*. As duas subfamílias agrupam 15 gêneros e 75 espécies, cujos representantes infectam uma larga variedade de hospedeiros dos reinos animal (vertebrados e invertebrados) e vegetal, bem como micro-organismos (bactérias, protozoários e fungos). A subfamília *Spinareovirinae* inclui nove gêneros (*Aquareovirus*, *Coltivirus*, *Cypovirus*, *Dinovernavirus*, *Fijivirus*, *Idnoreovirus*, *Mycoreovirus*, *Orthoreovirus* e *Oryzavirus*) e a *Sedoreovirinae* outros seis gêneros (*Cardoreovirus*, *Mimoreovirus*, *Orbivirus*, *Phytoreovirus*, *Rotavirus* e *Seadornavirus*) (ICTV, 2015).

O gênero *Rotavirus* agrupa nove espécies nomeadas de *Rotavírus A* a *Rotavírus I* (RVA-RVI). As espécies A, B, C e H infectam mamíferos, incluindo o homem, sendo RVA a espécie de maior importância epidemiológica (ALAM et al., 2007; ICTV, 2015; MIHALOV-KOVÁCS et al., 2015; YANG et al., 2004).

1.3. Rotavírus A

1.3.1. Morfologia

RVA é um vírus desnudo com simetria icosaédrica e diâmetro aproximado de 100 nanômetros (nm). A partícula viral íntegra é formada por três camadas concêntricas de proteínas denominadas, capsídeos externo, intermediário e interno ou *core*, que envolve o genoma viral, composto por 11 segmentos de RNA de fita dupla (*dsRNA – double-strand ribonucleic acid*), os quais codificam seis proteínas estruturais (VP – *viral*

protein), VP1-4, VP6 e VP7 e seis não estruturais (NSP – *non-structural protein*), NSP1-6 (ESTES, KAPIKIAN, 2007) (Figuras 1 e 2).

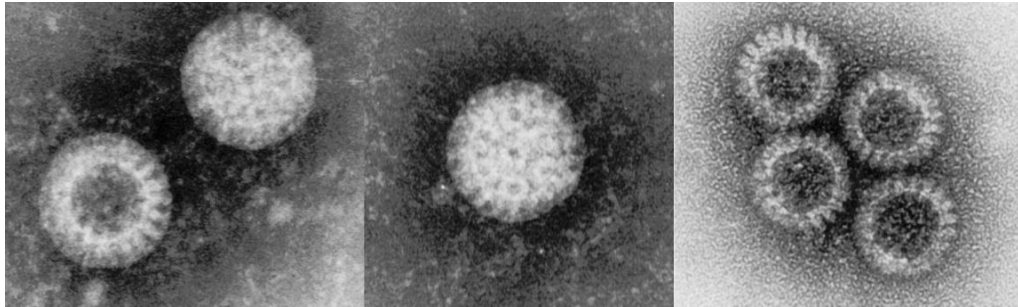


Figura 1. Microscopia eletrônica de partículas completas e seccionadas de rotavírus isolados de espécimes fecais de humanos. Fonte: ICTV, 2015.

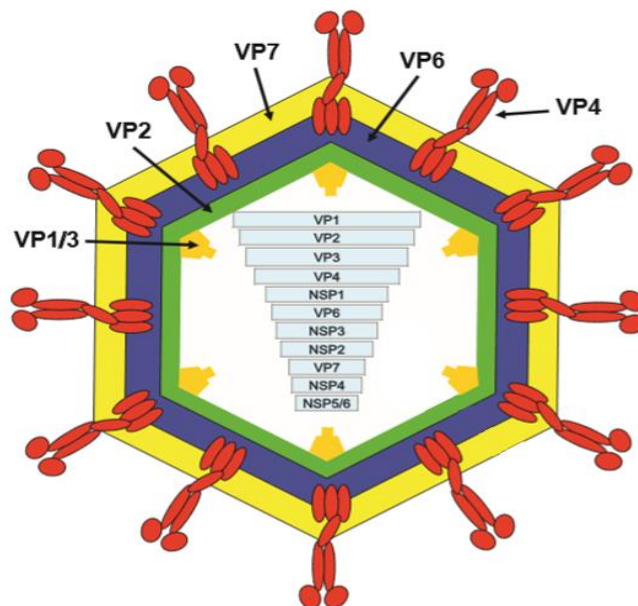


Figura 2. Diagrama esquemático da partícula viral composta por triplo capsídeo proteico e RNA genômico representando as proteínas codificadas. Fonte: ESTES, GREENBERG, 2013.

O capsídeo externo de RVA é formado por 780 cópias da proteína VP7, do qual emergem espículas formadas por 120 cópias de VP4. Essas possuem propriedades antigênicas e imunogênicas, capazes de elicitar a produção de anticorpos protetores. O capsídeo intermediário é composto por 780 cópias de VP6, e o *core* é constituído por 120 cópias de VP2 onde, internamente, é encontrado o complexo VP1/VP3. Os três capsídeos intercomunicam-se através de três tipos de canais (tipo I, II e III) que permitem a

ação de ribonucleases. A UTR 3' é precedida por uma região conservada, não adenilada e finalizada por duas citosinas (ESTES, GREENBERG, 2013).

A maioria dos segmentos de *dsRNA* contém uma sequência consenso 5'-UGUGACC-3', que possui sinais para expressão gênica e replicação do genoma, sendo que a sequência GACC atua como promotor de tradução do *mRNA* viral. O comprimento das UTRs 5' e 3' varia entre os segmentos genômicos, porém, são altamente conservados entre amostras semelhantes. No geral, os diferentes segmentos genômicos de RVA possuem uma ORF, com exceção do segmento codificante de VP7 (genes 7, 8 ou 9) e do segmento 11 que contam com regiões adicionais, *in-phase* e *out-phase*, respectivamente (ESTES, GREENBERG, 2013).

1.3.3. Proteínas de RVA

1.3.3.1. Proteínas estruturais

VP1: Proteína globular com aproximadamente 1.088 aminoácidos (aa) e massa molecular de aproximadamente 125 quilodáltons (kDa), codificada pelo segmento 1, que possui em torno de 3.302 pb (ESTES, GREENBERG, 2013). É disposta na porção interna do *core* viral em associação com VP2 e VP3, tendo função de RNA-polimerase-RNA-dependente (RpRd), replicase e transcriptase, sendo essencial no processo da replicação viral (ESTES, GREENBERG, 2013; PATTON et al., 1999).

Estruturalmente, VP1 é formada por três domínios: aminoterminal (N-terminal); polimerase, que compreende três subdomínios onde são encontrados seis motivos (A-F) comuns às RpRds, e carboxiterminal (C-terminal). Esses se organizam de modo a formar uma estrutura com quatro canais que circundam uma região central, conhecida como centro catalítico. Quando da replicação viral, os segmentos de RNA de sentido positivo atuam como *mRNA*, enquanto o de RNA de sentido negativo dá origem ao *dsRNA* genômico (ESTES, GREENBERG, 2013; LU et al., 2008).

VP2: Codificada pelo segmento 2 (2.690 pb), possui massa molecular de 84 kDa e aproximadamente 880 aa (ESTES, GREENBERG, 2013). É organizada na forma de dímeros, e cada subunidade apresenta três subdomínios: apical, central e de dimerização, além dos domínios N-terminal e C-terminal. Diferenças no domínio N-terminal permite

a distinção de VP2 em duas isoformas, VP2-A e VP2-B, cuja interação resulta na formação do *core* viral onde, internamente, encontra-se o complexo VP1/VP3 e os 11 segmentos de *dsRNA* genômico (ESTES, GREENBERG, 2013; MCCLAIN et al., 2010).

VP2 tem papel na replicação do vírus, sendo essencial para as atividades de replicase e transcriptase da VP1 e, no processo de encapsidação do genoma (BOUDREAUX et al., 2013; MANSELL, PATTON, 1990; PATTON et al., 1997). Ademais, é altamente imunogênica e a variação antigênica observada na proteína tem levado a classificação em subgrupos (SGs) I e II (MCDONALD, PATTON, 2008; SVENSSON et al., 1990; TANIGUCHI, URASAWA, URASAWA, 1986).

VP3: Formada por 835 aa, tem massa molecular de 98 kDa e é codificada pelo segmento 3 (2.591 pb). Possui atividade de fosfodiesterase, guanililtransferase e metilase, as quais são essenciais para a formação da estrutura *cap* 5' (CHEN et al., 1999; JAYARAM, ESTES, PRASAD, 2004; LIU, MATTION, ESTES, 1992; PATTON, CHEN, 1999; PIZARRO et al., 1991).

Embora a estrutura de VP3 não seja ainda claramente descrita, estudos que utilizam alinhamento de sequências e modelagem por homologia estrutural sugerem que a proteína possua um domínio N-terminal variável (conforme a espécie de rotavírus) de até 188 aa, com função desconhecida. Essa extremidade é seguida por um domínio guanina-N7-metiltransferase (N7-MTase), intercalado pelo domínio ribose-2'-O-metiltransferase (2'-O-MTase) e sucedido pelo domínio guanililtransferase/RNA trifosfatase (GTase/RTPase). Em algumas espécies de rotavírus (RVA, RVB e RVG), encontra-se ainda um domínio PDE (fosfodiesterase) na extremidade C-terminal (OGDEN et al., 2014; ZHANG et al., 2013).

VP4: Codificada pelo segmento 4 (2.362 pb), possui 776 aa e massa molecular de 86 kDa. Apresenta-se na forma de espículas que se projetam do capsídeo externo formado por VP7 (ESTES, GREENBERG, 2013; PRASAD et al., 1990). É requerida no processo de adsorção do vírus à célula hospedeira onde, pela ação de proteases, é clivada em dois fragmentos proteicos, VP8* e VP5*, os quais contêm sítios de ligação para receptores de membrana, etapa fundamental para penetração do vírus na célula (ESTES, GREENBERG, 2013).

Estruturalmente, a VP4 intacta apresenta um domínio N-terminal ancorado sobre um domínio C-terminal, mas quando clivada, conta com cinco domínios: hélice α , lectina, barril β , espiral-enrolado (*c-c* – *coiled-coil*) e C-terminal, sendo os dois primeiros componentes do fragmento VP8*, e os demais de VP5*, que conta também com um domínio antigênico (ESTES, GREENBERG, 2013; SETTEMBRE et al., 2011). VP4 de RVA de alguns animais apresenta atividade hemaglutinante (BASTARDO, HOLMES, 1980; KALICA, FLORES, GREENBERG, 1983). A proteína é também altamente imunogênica, sendo capaz de elicitar a formação de anticorpos neutralizantes que contribuem para a resposta imune homotípica e heterotípica (GORRELL, BISHOP, 1999; JOHANSEN, SVENSSON, 1997) (Figura 4).

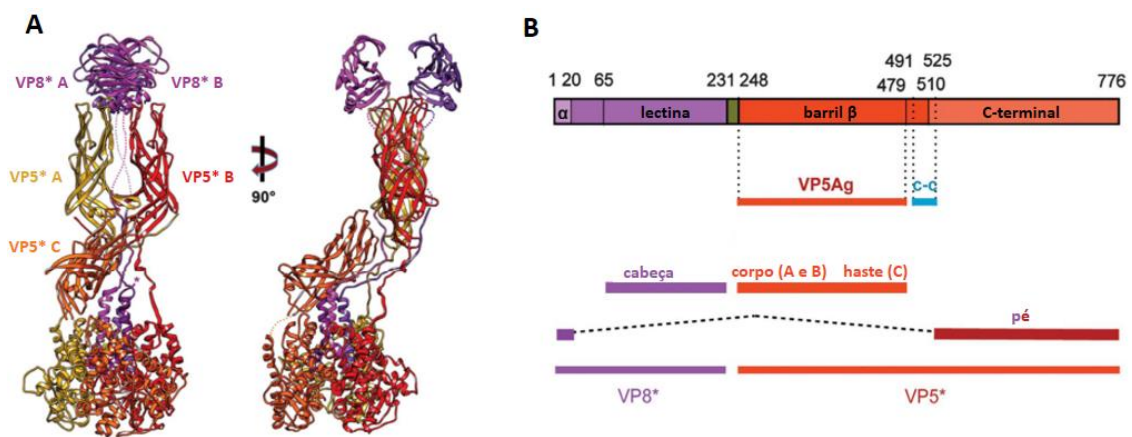


Figura 4. (A) Representação da espícula intacta de VP4. Porções globulares A e B de VP8* (roxo) e cadeias A (amarelo), B (vermelho) e C (laranja) de VP5*. (B) Diagrama esquemático da cadeia polipeptídica de VP4. Fragmentos VP8* (roxo) e VP5* (vermelho) gerados após clivagem com remoção dos resíduos 232-247 (verde). VP8* inclui os domínios hélice α e lectina e VP5*, os domínios barril β , c-c e C-terminal. O domínio barril β é denominado “domínio antigênico” (VP5Ag). A espícula de VP4 após clivagem apresenta “cabeça” (domínio lectina), “corpo” (domínios barril β das cadeias A e B de VP5*), “haste” (domínio barril β da cadeia C de VP5*) e “pé” (domínio hélice α de VP8* e domínio C-terminal). Adaptado de SETTEMBRE et al., 2011.

VP6: Codificada pelo segmento 6 (1.356 pb), possui 397 aa e massa molecular de 41 kDa. É um dos principais constituintes da partícula viral, sendo responsável pela formação do capsídeo intermediário (ESTES, GREENBERG, 2013). VP6 apresenta-se na forma de trímeros e, estruturalmente, cada subunidade possui dois domínios, B (hélice α) e H (folhas β), os quais têm função na interação com as proteínas que constituem o *core* (VP2) e o capsídeo externo (VP7 e VP4) (CHARPILLENNE et al., 2002; MATHIEU, 2001).

A proteína participa da replicação viral, sendo requerida no processo de transcrição do mRNA (CHARPILLENNE et al., 2002). Possui propriedades antigênica e imunogênica e, embora não seja responsável pela formação de anticorpos neutralizantes, induz resposta imune heterotípica (CORTHÉSY et al., 2006; JALILVAND, MARASHI, SHOJA, 2015). Variações no segmento codante de VP6 permitem a classificação dos rotavírus em espécies (A-I), e para RVA, por classificação sorológica, a divisão em subgrupos (I, II, I e II e Não I/Não II) (ESTES, GREENBERG, 2013).

VP7: Constituída por 326 aa, massa molecular de 37 kDa, é codificada pelos segmentos 7, 8 ou 9 (1.062 pb) de acordo com a amostra viral (ESTES, COHEN, 1989). É uma glicoproteína que constitui o capsídeo externo do vírus do qual emergem espículas de VP4 (ESTES, GREENBERG, 2013). Organizada na forma de trímeros, os quais são estabilizados por íons cálcio (Ca^{2+}), a estrutura primária inclui uma sequência de sinalização, seguida por quatro domínios: N-terminal, domínio I (enovelamento de Rossman), que é intercalado pelo domínio II (barril β) e C-terminal (AOKI et al., 2009; DORMITZER, GREENBERG, HARRISON, 2000).

Na sequência de sinalização há dois domínios hidrofóbicos, H1 (resíduos 1-29) e H2 (resíduos 30-50), ambos têm um papel no direcionamento da proteína VP7 para dentro do retículo endoplasmático durante a replicação (WHITFELD et al., 1987). Essa sequência sinalizadora (resíduos 1-50) está ausente na TLP, sendo conservada a porção glicoproteica (CHEN et al., 2009; ERICSON et al., 1983). Por crio-eletromicroscopia, observa-se que a partir do domínio N-terminal há um ponto de interação entre VP7 e VP6, (CHEN et al., 2009). VP7 é altamente imunogênica, sendo capaz de elicitar a formação de anticorpos neutralizantes (ESTES, GREENBERG, 2013) (Figura 5).

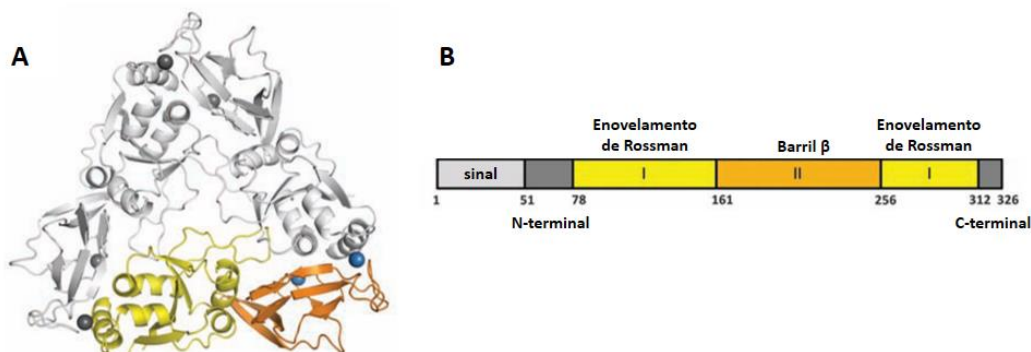


Figura 5. (A) Representação do trímero de VP7 mostrando os domínios I – enovelamento de Rossman (amarelo) e II – Barril β (laranja) e íons Ca^{2+} (azul). (B) Diagrama esquemático da cadeia polipeptídica de VP7. Região de sinalização (cinza), domínios I (amarelo) e II (laranja) e, regiões N- e C-terminal (grafite) da glicoproteína. Adaptado de AOKI et al., 2009.

1.3.3.2. Proteínas não estruturais

NSP1: Produto do gene 5 (1.581 pb), conta com 491 aa e massa molecular de 58 kDa. A proteína possui um domínio N-terminal rico em cisteína, conservado entre as amostras de RVA (ESTES, GREENBERG, 2013; HUA, MANSELL, PATTON, 1993). Tem afinidade por zinco, cujo domínio parece estar localizado na região N-terminal, juntamente com o domínio de ligação ao RNA de fita simples (*ssRNA – single-stranded ribonucleic acid*) (BROTTIER et al., 1992; HUA, CHEN, PATTON, 1994). Essa proteína está envolvida na resposta imune inata atuando como antagonista da via de indução de *interferon*, o que tem levado à sugestão de participação na virulência de RVA (BARRO, PATTON, 2005, 2007; MORELLI, OGDEN, PATTON, 2015).

NSP2: Codificada pelo segmento 8 (1.059 pb), dependendo da amostra. Possui 317 aa e massa molecular de 36 kDa. É formada por monômeros que apresentam dois domínios: N-terminal (hélice α e folhas β) e C-terminal (folhas β antiparalelas flanqueadas por hélice α). Os monômeros se organizam formando octâmeros com uma fenda catalítica central recoberta por resíduos básicos, incluindo um resíduo catalítico de histidina (H225) com a sugestão de que tenha função semelhante ao observado na célula (ESTES, GREENBERG, 2013; JAYARAM, ESTES, PRASAD, 2002; LIMA, KLEIN, HENDRICKSON, 1997).

Tem afinidade por *ssRNA* e possui atividade enzimática de nucleosídeo trifosfatase, nucleosídeo difosfatase, cinase e RTPase (KUMAR et al., 2007; TARAPOREWALA, CHEN, PATTON, 1999; VASQUEZ-DEL CARPIO et al., 2006). Sugere-se que essas funções enzimáticas atuem como um motor molecular que utiliza a energia derivada da atividade da adenosina trifosfatase para catalisar as etapas de replicação e empacotamento do genoma viral (TARAPOREWALA, CHEN, PATTON, 1999). Na célula infectada, NSP2 é encontrada associada ao complexo enzimático (VP1-VP3 e VP2) e à proteína NSP5, com a qual forma o viroplasma (estrutura elétron-densa observada no citoplasma), o que reforça o papel da NSP2 na replicação e empacotamento do genoma (APONTE, PONCET, COHEN, 1996; JIANG et al., 2006; SILVESTRE, TARAPOREWALA, PATTON, 2004).

NSP3: Produto do gene 7 (1.104 pb) é constituída por 315 aa e massa molecular de 34 kDa. NSP3 se organiza na forma de um homodímero assimétrico que apresenta dois segmentos N-terminal e dois C-terminal, que se entrelaçam formando um túnel de resíduos básicos que reconhece e se liga à sequência 3' do *mRNA* (DEO et al., 2002). Sugere-se que a ligação de NSP3 ao *mRNA* seja um possível mecanismo de transporte desse para o viroplasma e subsequente replicação (PESAVENTO et al., 2006). Funcionalmente, NSP3 atua de maneira semelhante à proteína de ligação a cauda poliadenilada (PABP – *polyadenylated binding protein*), presente nos eucariotos, que reconhece e se liga à cauda poliadenilada da extremidade 3' dos *mRNAs* eucarióticos, onde participa do processamento de pré-*mRNAs*, regulação da estabilidade e transporte dos *mRNAs* do núcleo para o citoplasma e, início e término da tradução (ELISEEVA, LYABIN, OVCHINNIKOV, 2013).

Como os *mRNAs* de RVA não possuem cauda poli (A), NSP3 se liga a uma sequência consenso da extremidade 3' e, junto com o fator de iniciação eucariótico 4 gama (eIF4G – *eukaryotic translation initiation factor 4 gamma*), circulariza o *mRNA* viral favorecendo a sua tradução e, conseqüentemente, interrompendo a tradução do *mRNA* celular (PADILLA-NORIEGA, PANIAGUA, GUZMÁN-LEÓN, 2002; VENDE et al., 2000). Esse modelo tem sido amplamente aceito, mas um estudo de silenciamento de NSP3 e eIF4G sugere que a interação com o fator de iniciação não é essencial para a tradução do *mRNA*, sendo, no entanto, requerida para a interrupção da tradução dos *mRNAs* celulares. Assim, a interação de NSP3 com a sequência 3' do *mRNA* viral teria por função protegê-lo da degradação (MONTERO, ARIAS, LOPEZ, 2006).

NSP4: Apresenta 175 aa, massa molecular de 20 kDa, sendo codificada pelo segmento 10 (751 pb) (ESTES, GREENBERG, 2013). É uma proteína multifuncional essencial para a replicação, transcrição e morfogênese, sendo reconhecida como uma enterotoxina viral, visto que a administração de peptídeo sintético produzido para a proteína (114-135) em camundongos neonatos pode induzir a diarreia (BALL et al., 1996; LÓPEZ et al., 2005; SILVESTRI et al., 2005; ZAMBRANO et al., 2008). Na célula infectada, é identificada como uma glicoproteína transmembrana no retículo endoplasmático (RE) (BERGMANN et al., 1989; CHAN, AU, ESTES, 1988). NSP4 possui três domínios hidrofóbicos (H1-H3) localizados na extremidade N-terminal. O domínio glicosilado H1 está orientado para o lúmen do RE, H2 consiste no domínio transmembrana e H3, que está localizado no

citoplasma, apresenta um domínio de viroporina, seguido de um domínio c-c e uma extremidade C-terminal flexível (BOWMAN et al., 2000; ESTES, KAPIKIAN, 2007; HYSER et al., 2010).

Viroporinas são pequenas proteínas virais hidrofóbicas que destroem a integridade das membranas e a homeostase iônica o que facilita a entrada, montagem e a liberação do vírus (GONZALEZ, CARRASCO, 2003). É possível que a atividade de viroporina de NSP4 esteja relacionada à elevação na concentração de íons Ca^{2+} no citoplasma da célula infectada, fator importante para a replicação e montagem das partículas virais (ESTES, KAPIKIAN, 2007; HYSER et al., 2010). NSP4 pode ser encontrada em diferentes formas estruturais incluindo complexos hetero-oligoméricos com VP4 e VP7, que se formam durante o processo de maturação do vírus (BOWMAN et al., 2000; CHACKO et al., 2011).

NSP5: Produto do gene 11 (667 pb) apresenta aproximadamente 175 aa e massa molecular de 21 kDa (ESTES, GREENBERG, 2013). É uma proteína fosforilada rica em resíduos de serina e treonina, sendo encontrada na forma de dímeros em associação com NSP2. Também pode se apresentar em diferentes isoformas que variam de hipofosforilada (28 kDa) até hiperfosforilada (32 kDa) (AFRIKANNOVA et al., 1996; BLACKHALL et al., 1998; PONCET et al., 1997; WELCH, CRAWFORD, ESTES, 1989). O mecanismo de fosforilação de NSP5 não está claro, sendo sugerida a autofosforilação devido a indícios de que essa proteína possui atividade de cinase (BLACKHALL et al., 1997). Há ainda evidências de que cinases celulares, como as caseínas I e II, sejam envolvidas no processo de fosforilação da proteína (CAMPAGNA et al., 2007; EICHWALD et al., 2004).

NSP5 está implicada na replicação viral, uma vez que forma o complexo NSP2-NSP5 que está associado à formação do viroplasma. Além disso, interage com outras proteínas (VP1, VP2 e NSP6) e com *ssRNA* e *dsRNA* (ARNOLDI et al., 2007; BEROIS et al., 2003; JIANG et al., 2006; TORRES-VEGA et al., 2000; VENDE et al., 2002). Sugere-se que estruturalmente NSP5 apresenta resíduos iniciais da extremidade N-terminal que não são requeridos para a ligação com NSP2 e para a formação do viroplasma, diferente do observado para a extremidade C-terminal, que parece conter o sinal para a formação dessa estrutura (JIANG et al., 2006; MARTIN et al., 2011; MOHAN et al. 2003).

NSP6: É uma proteína pequena (12 kDa) que não é observada em todas as amostras de RVA. Quando presente é produto de uma segunda ORF (*out-of-phase*) encontrada no segmento 11, que codifica NSP5 (MATTION et al., 1991). Possui alto índice de modificação e sua degradação pode ocorrer até duas horas após sua síntese. Apresenta afinidade por *ssRNA*, *dsRNA* e por NSP5. Sugere-se que esteja localizada no viroplasma, o que pode indicar sua possível participação no processo da replicação viral (RAINSFORD, MCCRAE, 2007; TORRES-VEGA et al., 2000). Ademais, embora sua função não esteja claramente descrita, estudo sugere que a NSP6 de diversas amostras de RVA apresenta uma extremidade N-terminal hélice α capaz de se ligar às mitocôndrias, o que poderia afetar o seu funcionamento (HOLLOWAY et al., 2015).

1.4. Variabilidade genômica/Antigênica de RVA

As variações genômicas dos segmentos *dsRNA* de RVA se refletem na geração de diferentes genótipos que são evidenciados também a partir das variações antigênicas das respectivas proteínas, como abaixo descrito:

Segmento 1 (VP1): Têm sido descritos 18 genótipos distinguidos por identidade mínima de 83%, sendo denominados R, devido à função de RpRd da proteína codificada (MATTHIJNSSENS et al., 2008; RCWG, 2016).

Segmento 2 (VP2): Possui 17 genótipos caracterizados por identidade mínima de 84%, denominados C por compor o *core* viral (MATTHIJNSSENS et al., 2008; RCWG, 2016). Adicionalmente, a variabilidade do segmento tem permitido identificar dois subgrupos. Esta variabilidade foi observada a partir da reatividade com anticorpos de ratos provenientes da inoculação de RVA de origem humana (YO-60) onde amostras não reativas com YO-60 são designadas VP2 SGI e as reativas, VP2 SGII (SVENSSON et al., 1990; TANIGUCHI, URASAWA, URASAWA, 1986). Para algumas amostras, é observada associação entre os SGs de VP2 e VP6, visto que há amostras caracterizadas como VP2 SGI/ VP6 SGI e outras como VP2 SGII/ VP6 SGII (TANIGUCHI, URASAWA, URASAWA, 1986; URASAWA et al., 1990).

Segmento 3 (VP3): A variação genômica possibilita a diferenciação de 17 genótipos com identidade mínima de 81%, sendo denominados M, devido a função de metiltransferase da proteína (MATTHIJNSSENS et al., 2008; RCWG, 2016).

Segmento 4 (VP4): Baseado nesse segmento, RVA tem sido classificado tanto em genótipos quanto em sorotipos (em função da imunogenicidade da proteína), sendo os últimos definidos a partir de ensaios de neutralização e reatividade com anticorpos monoclonais e policlonais. Esses são denominados P em função da sensibilidade da proteína a proteases. Tem-se até o momento 14 sorotipos e 47 genótipos, cuja diferenciação se dá pela identidade mínima de 80% (ESTES, KAPIKIAN, 2007; MATTHIJNSSENS et al., 2008; RCWG, 2016).

Segmento 6 (VP6): A variabilidade permite a distinção de grupos de RVA (A-H), bem como, em subgrupos na espécie A (SGI, SGII, SGI+II e SGnão-I/não-II), definidos pela reatividade frente a anticorpos monoclonais (MAbs – *monoclonal antibodies*) específicos (ESTES, KAPIKIAN, 2007; GORZIGLIA et al., 1988; KAPIKIAN et al., 1981; MATTHIJNSSENS et al., 2008). Ademais, têm sido identificados 24 genótipos que podem ser diferenciados por identidade mínima de 85%, os quais são denominados I, pelo fato de a proteína codificada compor o capsídeo intermediário (MATTHIJNSSENS et al., 2008; RCWG, 2016).

Segmento 9, 7 ou 8 (VP7): Similar a VP4, identificam-se diferentes sorotipos e genótipos os quais são denominados G em função da proteína ser glicosilada. Até o momento foram identificados 20 sorotipos e 32 genótipos diferenciados por identidade mínima de 80% (ESTES, KAPIKIAN, 2007; MATTHIJNSSENS et al., 2008; RCWG, 2016).

Segmento 5 (NSP1): Com base nesse segmento tem sido reconhecido 28 genótipos, diferenciados por identidade mínima de 79%, denominados A visto que a proteína respectiva atua como antagonista de *interferon* (MATTHIJNSSENS et al., 2008; RCWG, 2016).

Segmento 8, 7 ou 9 (NSP2): Apresenta 18 genótipos diferenciados por identidade mínima de 85% e, denominados N, devido à função de NTPase da proteína (MATTHIJNSSENS et al., 2008; RCWG, 2016).

Segmento 7, 8 ou 9 (NSP3): Possui 19 genótipos caracterizados por identidade mínima de 85%, denominados T, devido ao papel promotor de tradução da proteína (MATTHIJNSSENS et al., 2008; RCWG, 2016).

Segmento 10 (NSP4): Apresenta considerável variabilidade e possui 24 genótipos distinguidos pela identidade mínima de 85% na sequência de nucleotídeos. São

denominados E, em função da proteína respectiva ser considerada uma enterotoxina (MATTHIJNSSENS et al., 2008; RCWG, 2016).

Segmento 11 (NSP5/6): Têm sido relatados 19 genótipos, caracterizados por identidade mínima de 91% e denominados H, visto a ação de NSP5 como fosfoproteína (MATTHIJNSSENS et al., 2008; RCWG, 2016).

RVA tem sido classificado tendo como base a associação de genótipos G e P, o denominado sistema binário, bem como pela associação desses aos demais genótipos. Considerando o sistema binário, observa-se que as principais associações são G1, G3, G4 e G9 com P[8], G2 com P[4] ou P[6] e, ainda, G3, G9 e G12 com P[9] (ESTES, GREENBERG, 2013).

A partir da associação de genótipos G e P aos demais genótipos tem sido admitido a denominada constelação genotípica, com a configuração de três genogrupos: genogrupo I, tendo como amostra protótipo a amostra Wa – G1P[8] – (I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1), o II, sendo a amostra protótipo a DS-1 – G2P[4] – (I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2) e o III, amostra protótipo AU-1 – G3P[9] – (I3-R3-C3-M3-A3-N3-T3-E3-H3). Amostras genogrupo I também podem ter associação G3P[8], G4P[8] e G9P[8]. O genogrupo III comporta amostras também com outras associações como G12P[9] (CASTELLO et al. 2009; GOLLOP et al. 1998; MATTHIJNSSENS et al. 2011). Ainda, amostras G12, com diferentes genótipos P, têm sido inclusas em qualquer um dos genogrupos (RAHMAN et al., 2007).

RVA também pode ser classificado com base no padrão de migração dos segmentos *dsRNA* na eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA). Nesse sentido, observa-se quatro classes no padrão de migração: classe I (segmentos 1-4), classe II (segmentos 5 e 6), classe III (segmentos 7-9) e classe IV (segmentos 10 e 11). Considerando a classe IV, observa-se padrão diferencial de migração para os segmentos 10 e 11 que permite a diferenciação das amostras em padrão “longo”, quando há rápida migração do segmento 11, posicionando-se no final do gel e, padrão “curto”, onde ocorre inversão dos segmentos 10 e 11, além do padrão “supercurto” no qual o segmento 11 se apresenta mais distante do segmento 10 (migração lenta) (ESTES, GREENBERG, 2013; HOLMES, 1996) (Figura 6).

Sugere-se que exista associação entre os padrões eletroferotípicos, subgrupos decorrentes de VP6 e sorotipos/genótipos de VP7. Amostras com padrão “longo” seriam SGII/sorotipo/genótipo 1, 3 ou 4, e amostras com padrão “curto”, SGI/sorotipo/genótipo

2 (MATSON et al., 1990; NAKAGOMI et al., 1989; SILVA et al., 2013; SOARES et al., 2010).

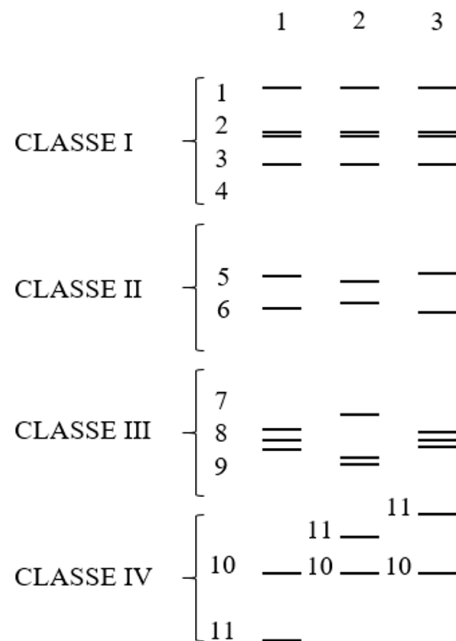


Figura 6. Representação do padrão de migração dos segmentos de *dsRNA* na EGPA. A canaleta 1 mostra o padrão “longo”, a 2 o padrão “curto” e a 3 o padrão “supercurto”. Adaptado de NAKAGOMI et al., 1999.

1.5. Replicação de RVA

A replicação de RVA é um processo complexo que envolve várias etapas, as quais têm sido desvendadas a partir de estudos *in vitro* e *in vivo* (ESTES, KAPIKIAN, 2007). *In vivo*, estudos realizados com camundongos, bovinos e suínos gnotobióticos (*germ-free*), têm mostrado que RVA possui tropismo por enterócitos diferenciados do intestino delgado (GUERRERO, SANTANA, ACOSTA, 2010; HULST et al., 2008; ITURRIZA-GÓMARA et al., 2002; KIM et al., 2011). Por outro lado, estudos também mostram a detecção viral em humanos a partir do sistema nervoso central o que sugere a existência de células susceptíveis (KIRTON et al., 2005).

Estudos *in vitro* utilizando culturas celulares, os quais são admitidos mimetizarem o processo *in vivo*, mostram que a adsorção viral à célula é feita pela VP4. Para sua

atividade, há necessidade de clivagem, feita por proteases como a tripsina, abundante no intestino delgado. A clivagem resulta na formação de dois fragmentos, VP5* e VP8*, (FIORE, GREENBERG, MACKOW, 1991; LÓPEZ et al., 1985). O fragmento que se liga inicialmente ao receptor primário celular é admitido ser VP8*, seguido pela ligação de VP5* ao co-receptor, o que potencializa a entrada do vírus na célula (ARIAS et al., 1996; ESTES, GRAHAM, MASON, 1981; ESTES, GREENBERG, 2013; KALJOT et al., 1988).

Diferentes classes de receptores primários têm sido admitidas para RVA, dependendo da espécie hospedeira. Estudos têm mostrado que há amostras de RVA que utilizam como receptores moléculas que contêm ácido siálico (FLEMING et al., 2014; GUO et al., 1999; ISA et al., 2006), bem como chaperonas, como a proteína de choque térmico 70 (ESTES, GREENBERG, 2013). Outra classe de receptor que tem sido admitida são antígenos de grupo histo-sanguíneo, os quais são dependentes de uma enzima funcional codificada pelo gene celular FUT2 (HU et al., 2012; IMBERT-MARCILLE et al., 2014). Como co-receptores têm sido admitidos diferentes classes de integrinas ($\alpha v\beta 3$, $\alpha 4\beta 1$ e $\alpha 2\beta 1$) (DORMITZER et al., 2002a, 2002b; ESTES, GREENBERG, 2013; FLEMING et al., 2014; GRAHAM et al., 2005).

A penetração na célula parece ocorrer em um processo multipassos que envolve a interação de VP5*, VP8* e VP7 (ESTES, GREENBERG, 2013). Admite-se que essa etapa possa ocorrer diretamente por translocação através da membrana celular ou por via endocítica (DÍAZ-SALINAS et al., 2013; KALJOT et al., 1988). Após a penetração, há liberação do vírus no citoplasma e, subsequente remoção do capsídeo externo resultando em partícula de duplo capsídeo, denominada de DLP (*double particle*), composta pelos capsídeos intermediário (VP6) e interno (VP2 e o complexo enzimático VP1/VP3) circundando o genoma viral (ESTES, GREENBERG, 2013). As DLPs são transcricionalmente competentes e em seu interior são sintetizados os *mRNAs* (11 segmentos) e o *ssRNA* sentido negativo que serve como molde para a síntese do *dsRNA* (ESTES, GREENBERG, 2013; LAWTON, ESTES, PRASAD, 1997; LU et al., 2008).

Uma vez liberados no citoplasma, os transcritos são traduzidos pela maquinaria celular. VP7 e NSP4 são sintetizadas em ribossomos associados ao retículo endoplasmático (RE), enquanto as demais VPs e NSPs são sintetizadas em ribossomos livres (ESTES, GREENBERG, 2013). A etapa de tradução do *mRNA* tem a participação da NSP3, a qual atua de modo semelhante à PABP de eucariotos. Há evidências de que

NSP3 se liga à extremidade 3' conservada dos *mRNAs* e ao eIF4G promovendo a circularização desses segmentos e levando-os até os ribossomos para a síntese das proteínas virais (PADILLA-NORIEGA, PANIAGUA, GUZMÁN-LEÓN, 2002; PESAVENTO et al., 2006; VENDE et al., 2000). Admite-se que as proteínas produzidas se acumulem em uma estrutura membranosa de origem celular, elétron-densa, formada pela ação de NSP2 e NSP5 (viroplasma) que é observada nas proximidades do RE (ALTENBURG, GRAHAM, ESTES, 1980). Nessa estrutura, ocorre a formação de novas DLPs e transcrição para síntese do genoma (ESTES, GREENBERG, 2013).

Após o processo de formação das DLPs, essas migram para dentro do RE onde VP6 interage com o domínio transmembrana de NSP4 para a formação de um envelope lipídico transitório. Esse envelope é posteriormente perdido para a incorporação da VP7, formando o capsídeo externo ao qual se acopla as espículas de VP4. Uma vez completas, as partículas de tripla camada (TLPs) são liberadas por lise ou por exocitose (ESTES, GREENBERG, 2013; O'BRIEN, TAYLOR, BELLAMY, 2000) (Figura 7).

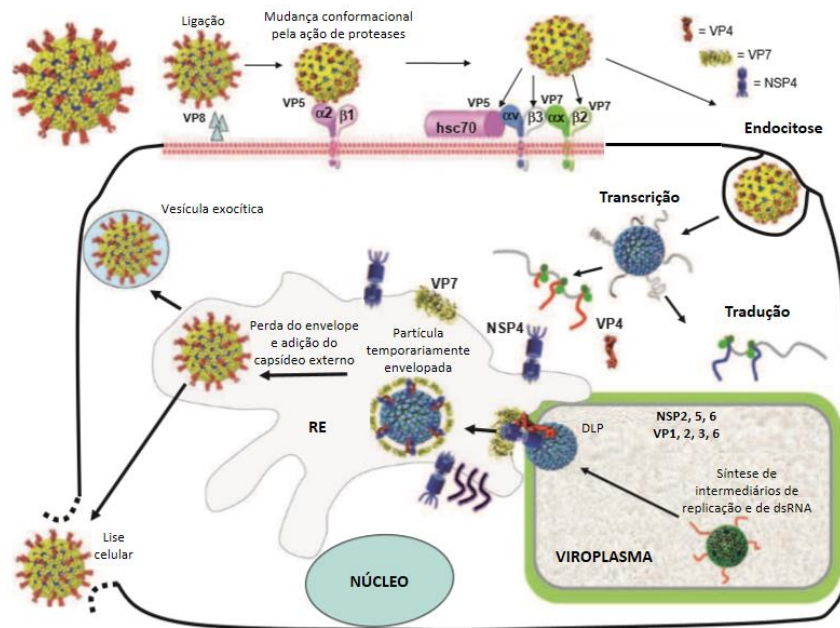


Figura 7. Diagrama esquemático do processo de replicação de RVA. Adaptado de ESTES, GREENBERG, 2013.

1.6. Evolução de RVA

Diferentes mecanismos contribuem para variabilidade genômica e antigênica de RVA que incluem: mutações pontuais, reagrupamento, recombinação, rearranjo e

transmissão interespécie, os quais podem gerar variantes com uma vasta diversidade inter e intragenotípica (GOUVEA, BRANTLY, 1995; MCDONALD et al., 2016; RAMIG, 1997).

As mutações são consideradas fontes primárias de diversidade genética e podem resultar de falhas no processo de transcrição (GOUVEA, BRANTLY, 1995; MANEEKARN, KHAMRIN, USHIJIMA, 2010; RAMIG, 1997). RVA, assim como outros vírus RNA, apresenta elevada taxa de mutação, em torno de 5×10^{-5} mutações por nucleotídeo por ciclo replicativo, o que representa a ocorrência de ao menos uma mutação a cada ciclo de replicação em relação ao genoma do vírus parental (MANEEKARN, KHAMRIN, USHIJIMA, 2010; RAMIG, 1997). Parte dessas mutações são silenciosas e não resultam em alterações na proteína codificada, entretanto, outras podem gerar variabilidade contribuindo para a diferenciação de linhagens e sublinhagens de um mesmo genótipo (ITURRIZA-GÓMARA et al., 2001, 2003).

A natureza segmentada do genoma de RVA favorece ainda, o reagrupamento, ou seja, a troca de segmentos genômicos durante co-infecções, quando duas ou mais amostras do vírus infectam uma única célula hospedeira, resultando na formação de uma progênie híbrida. No processo há a interação entre as moléculas de RNA genômico, e dessas com proteínas envolvidas no empacotamento do genoma viral durante a replicação (MCDONALD et al., 2016; RAMIG, 1997).

O sucesso desse mecanismo depende da compatibilidade entre os sinais existentes nos segmentos de RNA que mediam as interações. Assim, compreende-se que o reagrupamento pode originar amostras que apresentam alguma vantagem seletiva para o vírus, principalmente, quando os genes reagrupados codificam antígenos biologicamente importantes, como os que elicitam anticorpos neutralizantes e outros determinantes de virulência (MCDONALD et al., 2016; RAMIG, 1997). Admite-se que a interação adequada entre os segmentos reagrupados possa contribuir para a permanência de certos genótipos de RVA nas populações humana e animal em detrimento a outros (MCDONALD et al., 2009).

A recombinação é outro processo que contribui para a evolução de RVA, e consiste na substituição de sequências nucleotídicas no segmento de RNA genômico entre uma sequência doadora e outra denominada receptora, gerando uma nova sequência com informação genética proveniente de mais de uma fonte (RAMIG, 1997; SIMON-LORIERE, HOLMES, 2011; WOROBEY, HOLMES, 1999). Geralmente a

recombinação ocorre em regiões com alta similaridade, sendo denominada homóloga e nesse caso a estrutura do RNA pode permanecer inalterada. Por outro lado, quando o ponto de substituição apresenta baixa similaridade, um novo segmento de RNA genômico pode ser formado contribuindo para o surgimento de uma nova amostra (SIMON-LORIERE, HOLMES, 2011; WOROBEY, HOLMES, 1999). Assim como as mutações pontuais, recombinação também contribui para a diferenciação entre linhagens e sublinhagens de um mesmo genótipo (PHAN et al., 2007).

O rearranjo genômico ocorre a partir de deleções ou duplicações na sequência do segmento genômico. Amostras rearranjadas, quando visualizadas por EGPA, podem apresentar segmentos extras com posicionamento não habitual o que auxilia na sua identificação (GAULT et al., 2001; RAMIG, 1997).

Ademais, a transmissão interespecie pode resultar na variabilidade de RVA, quando em infecções mistas, pode ocorrer reagrupamento entre amostras de origem humana e de origem animal, além de possíveis rearranjos entre segmentos homólogos (DÓRÓ et al., 2015; MARTELLA et al., 2010). Nesse caso, por EGPA, é possível a visualização de amostras atípicas caracterizadas por segmentos extras, bem como, amostras cujos segmentos compartilham características gênicas e antigênicas de amostras provenientes de humanos e animais (DELOGU et al., 2016; MANEEKARN, KHAMRIN, USHIJIMA, 2010).

1.7. Aspectos clínicos e patogenia de RVA

As infecções por RVA podem ser assintomáticas, subclínicas ou apresentarem-se sob a forma clássica da doença, a GEA, onde são observados sintomas de febre, vômito, dor abdominal e diarreia. A febre e o vômito têm duração média de até três dias, enquanto a diarreia, o sintoma mais comumente relatado, pode perdurar por 10 dias ou mais. A GEA, geralmente, é doença autolimitada, entretanto, a quantidade de episódios de vômito e diarreia podem resultar em desidratação grave e, por conseguinte em óbito (LINHARES, BRESSE, 2000; OLIVEIRA, LINHARES, 1999). Admite-se o desenvolvimento de sintomas e de doença grave estão associados à relação parasito-hospedeiro (ESTES, GREENBERG, 2013; ISMAILI-JAHA et al., 2014; LINHARES, BRESSE, 2000; OLIVEIRA, LINHARES, 1999).

RVA tem como rota de transmissão a via fecal-oral e, desse modo, água e alimentos contaminados, bem como o contato pessoa-pessoa podem favorecer a infecção. Após a infecção por RVA, o período médio de incubação tem sido estimado em 48 horas, sendo os enterócitos diferenciados do intestino delgado admitidos como as células-alvo para a replicação do vírus e, a excreção, feita pelas fezes (ESTES, GREENBERG, 2013).

Os enterócitos são um tipo celular que apresenta, em sua superfície apical, pequenos dobramentos da membrana plasmática, microvilosidades, que favorecem a execução das funções digestiva e absorptiva (GUYTON, CARNEIRO, 2006; JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2008). É nesse local que ocorre a multiplicação viral, sendo admitidos dois mecanismos que resultam em diarreia com possibilidade de desidratação:

1- Deficiência na absorção de macromoléculas: resultante da destruição dos enterócitos e substituição por células imaturas que ainda não possuem capacidade absorptiva. Como consequência, tem-se o acúmulo de macromoléculas no meio extracelular favorecendo a difusão água e eletrólitos para o exterior da célula. No processo, admite-se que a ação da NSP4 viral provoque isquemia dos vilos intestinais e influxo de íons Ca^{2+} para o citoplasma, o que pode resultar na lise celular e, por conseguinte, na redução da absorção intestinal (BALL et al., 1996; PÉREZ et al., 1998). O aumento de íons Ca^{2+} no meio intracelular promove maior efluxo de íons cloro (Cl^-) para o meio extracelular e, conseqüentemente, de água para o lúmen do intestino delgado favorecendo o processo diarreico (ANGEL et al., 1998; MORRIS et al., 1999);

2- Estimulação do sistema nervoso entérico: o sistema é formado por gânglios dos plexos submucoso e mioentérico que se dispõem abaixo do epitélio intestinal. Admite-se que NSP4 atue nesse sistema, resultando na maior liberação de fluídos eletrolíticos para o lúmen intestinal (COSTANZO, 2007; ESTES, GREENBERG, 2013).

1.8. Métodos de estudo de RVA

As manifestações clínicas da doença causada por RVA (diarreia, febre, vômito e dor abdominal) são genéricas quando comparadas àquelas causadas por outros vírus gastroentéricos, não sendo, portanto, suficientes para o diagnóstico clínico. Desse modo, para o diagnóstico acurado, bem como, para o estudo de RVA é necessário a detecção do vírus ou de seu genoma, do antígeno viral ou da observação de resposta sorológica específica (ESTES, GREENBERG, 2013).

A identificação do vírus pode ser feita por IME e ME pela visualização da partícula viral a partir do espécime clínico, e para o estudo da morfologia e da ultraestrutura das partículas virais (ESTES, GREENBERG, 2013; SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008).

Outro procedimento de estudo consiste na detecção do antígeno específico de RVA, que pode ser feita por soroneutralização, reação de fixação do complemento, imunofluorescência, hemaglutinação e aglutinação em látex (ESTES, GREENBERG, 2013; SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008). Assim como a IME e ME, essas metodologias são importantes para a triagem de RVA a partir do espécime clínico.

A identificação e caracterização do genoma viral pode ser feita por EGPA. Essa metodologia é sensível e específica, e permite a triagem de RVA a partir do espécime clínico. Pela técnica é possível inferir a espécie de rotavírus, o subgrupo de RVA e a ocorrência de infecções mistas (LOURENÇO et al., 1981; PEREIRA et al., 1983).

Técnicas de biologia molecular como hibridização *in situ*, hibridização em microarranjos (*microarray hybridization*), reação de transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (*reverse transcription polymerase chain reaction – RT-PCR*), reação de transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase quantitativa (*quantitative reverse transcription polymerase chain reaction – RT-qPCR*) e sequenciamento genômico, possibilitam a caracterização de genótipos e a quantificação das partículas virais (SANTOS, ROMANOS, WIGG, 2008).

Para a genotipagem, tem-se utilizado uma ferramenta *on-line* denominada RotaC, padronizada pelo grupo de trabalho, *Rotavirus Classification Working Group* (RCWG), que permite a comparação entre a sequência de nucleotídeos da amostra que se deseja caracterizar e as sequências protótipos de cada um dos genótipos existentes para um dado segmento (MAES et al., 2009; MATTHIJNSSENS et al., 2008).

Outra técnica importante para o estudo dos RVA consiste na utilização da cristalografia de raio-X para a caracterização das proteínas codificadas pelos 11 segmentos de *dsRNA* genômico (OGDEN et al., 2014). Adicionalmente, a modelagem molecular das proteínas de RVA, feita por homologia das sequências deduzidas de aminoácidos, tem sido útil na elucidação da estrutura proteica dos segmentos genômicos, visto que a técnica, baseia-se na construção da estrutura secundária ou terciária a partir de um modelo com identidade mínima de 30% (MALIK et al., 2014).

1.9. Vacinas para RVA

Visto a relevância epidemiológica de RVA como agente causador da GEA infantil, tem-se reunido esforços no sentido de desenvolver vacinas eficazes para o agente (ESTES, GREENBERG, 2013). Nesse contexto, desde os anos 80 há um esforço para o desenvolvimento de vacinas específicas. Uma primeira vacina elaborada foi originada da amostra bovina RIT4237 (G1P6[1]) atenuada, com triagem feita em crianças na Finlândia (VESIKARI et al., 1985), posteriormente, seguiram-se estudos para o desenvolvimento de vacinas a partir de amostras de origem animal e humana (BARNES et al., 1997; BHANDARI et al., 2006; CHANDRAN et al., 2010; CLARK et al., 1996; VESIKARI et al., 1990).

A primeira vacina licenciada para RVA foi denominada RotaShield®, que inclui a amostra MMU18006 proveniente de macaco *Rhesus* (G3) e três amostras recombinantes de isolados de humanos (G1, G2 e G4). Esta vacina tetravalente (RRV-TV) foi licenciada nos EUA em 1998, com administração por via oral em três doses, a crianças com dois, quatro e seis meses (HOCHWALD, KIVELA, 1999; PÉREZ-SCHAEL et al., 1997; RENNELS et al., 1996).

Após a administração de mais de 500.000 doses iniciaram-se relatos de intussuscepção, condição clínica que se refere à obstrução intestinal causada pela penetração uma alça de um segmento proximal do intestino delgado em outra imediatamente distal o que pode resultar em edema, isquemia e necrose (CDC, 1999; MACKSOUD, 1998). A ocorrência destes casos de intussuscepção foi associada à vacina para RVA o que culminou com a retirada de RotaShield® do mercado em julho de 1999 (CDC, 1999; MURPHY et al., 2001). Seguido esse fato, os estudos para o desenvolvimento de vacinas para RVA também passaram a considerar a segurança para a intussuscepção intestinal.

Depois de quase sete anos após a suspensão do uso de RotaShield® foram disponibilizadas outras duas vacinas também administradas por via oral, Rotarix® (GlaxoSmithKline) e RotaTeq® (Merck & Sharp Dohme). Rotarix® foi desenvolvida a partir da atenuação de amostra monovalente G1P[8] de origem humana e RotaTeq® é resultante da recombinação entre amostras de origem humana (G1-G4) e de origem bovina (WC3 – P[8]) (BERNSTEIN, 2006; TOM-REVZON, 2007). Ambas foram licenciadas em 2006 e são recomendadas pela WHO (WHO, 2015b).

Também houve tentativas para o desenvolvimento de vacinas a partir das proteínas do capsídeo intermediário (VP6) e do *core* (VP2), visto que estas são capazes de elicitar resposta imune (ALKADAH et al., 2013; PASTOR et al., 2014). O desenvolvimento de vacinas a partir *virus-like particles* (VLPs), recombinantes entre VP2 e VP6, tem sido considerado estratégia alternativa às vacinas em uso pois, embora Rotarix® e RotaTeq® apresentem considerável custo-benefício, estudos *in vivo* têm mostrado risco para a ocorrência de intussuscepção intestinal após a administração dessas vacinas (AZEVEDO, VLASOVA, SAIF, 2013; RHA et al., 2014).

1.10. Epidemiologia de RVA

A GEA é importante causa de morbimortalidade em crianças menores de cinco anos, principalmente em países em desenvolvimento (WHO, 2015b). Admite-se que essa enfermidade seja responsável por mais de 500.000 mortes, nessa faixa etária, em todo o mundo, das quais 215.000 são atribuídas a RVA, principalmente em crianças com até 24 meses (TATE et al., 2016). Desse modo, medidas preventivas, como melhoria no saneamento básico e no fornecimento de água e alimentos apropriados, bem como a vacinação, são requeridas para minimizar os custos financeiros e humanos causados pela GEA por RVA (WHO, 2015a, 2015b).

Desde 2006, duas vacinas (Rotarix®, GlaxoSmithKline e RotaTeq®, MerckSharpDhome) estão licenciadas em mais de 100 países (VESIKARI et al., 2006; RUIZ-PALACIOS et al., 2006), sendo recomendadas pela WHO, principalmente, em locais com elevado índice de morbimortalidade infantil por GEA (WHO, 2015b). Até maio de 2016, mais de 80 países introduziram uma das vacinas ao Programa Nacional de Imunização (PNI), incluindo o Brasil (MS, 2006; PATH, 2016).

Com o início do processo de vacinação, tem-se relatado o declínio das hospitalizações e do índice de mortalidade por GEA em crianças menores de cinco anos (DESAI et al., 2011; JUSTINO et al., 2011; PATERNINA-CAICEDO et al. 2015; TATE et al., 2016). Países da Europa e Estados Unidos têm relatado redução de até 84% das hospitalizações (KARAFILLAKIS, HASSOUNAH, ATCHISON, 2015; TATE et al., 2013), e no Brasil, bem como, em outros países da América Latina, a redução tem sido estimada em 48% a 81% (DESAI et al., 2011; LINHARES, JUSTINO, 2014).

Concomitante à redução das hospitalizações por GEA, tem-se observado também, a redução no índice de positividade para RVA, quando comparados os períodos pré e pós-vacina. Estudos realizados na Finlândia e no Iêmen reportaram redução de até 34% no índice de detecção para RVA (AMOOD AL-KAMARANY et al., 2016; HEMMING-HARLO et al., 2016). Na Bélgica, houve relato de redução de aproximadamente 77% na detecção do agente (STANDAERT et al., 2016). No Brasil, foi reportada redução de 42,2% na positividade para RVA nos primeiros dois anos após o início do processo de vacinação para o vírus (SÁFADI et al., 2010).

RVA apresenta sazonalidade, sendo detectado principalmente no inverno e em períodos frios e secos, embora em alguns países da África, Ásia e América do Sul, esta seja menos evidente (COOK et al., 1990). Sugere-se que o vento e a baixa umidade observado nesses períodos, combinados à precipitação em solo seco, possam viabilizar o transporte aéreo de material fecal contaminado presente no ambiente (ANSARI, SPRINGTHORPE, SATTAR, 1991; MOE, SHIRLEY, 1982).

No Brasil, há maior detecção do vírus entre maio e setembro, período considerado frio e seco nas Regiões Centro-Oeste, Sul e Sudeste (CARDOSO et al., 2000; MUNFORD et al., 2007, 2009). Por outro lado, nas Regiões Norte e Nordeste, RVA ocorre durante todo o ano (SILVA, SOUZA, MELO, 2010; STEWIEN et al., 1991). Contudo, admite-se o processo da vacinação para o vírus tem proporcionado alteração no padrão sazonal do vírus, sendo observado atraso no início da estação principal para sua circulação (BRAECKMAN et al., 2011; LUCHS et al., 2015; TATE, PARASHAR, 2011) ou mesmo a ausência de sazonalidade (DULGHEROFF et al., 2014).

Como mencionado, RVA apresenta grande diversidade genômica e antigênica que contribui para uma ampla variedade de genótipos, principalmente, em relação aos genótipos de VP7 (G) e VP4 (P) (BÁNYAI et al., 2012; DÓRÓ et al., 2014; SANTOS, HOSHINO, 2005). Considerando os genótipos G, admite-se que em todo o mundo, no período pré-vacina, G1-G4, correspondeu à maior parte das amostras positivas para RVA, embora G5, G8 e G9, também tenham sido reportados. O genótipo G5 tem sido observado, principalmente, na América do Sul e G8 na África, enquanto G9, tem ocorrido em todos os continentes. De modo geral, esses genótipos variam em predominância conforme o período e o local de estudo (SANTOS, HOSHINO, 2005).

Na Região Centro-Oeste do Brasil, também tem reportado a ocorrência dos genótipos G1-G4, com predominância alternada entre G1 e G2 (ANDREASI et al., 2007;

CARDOSO et al., 2000; MUNFORD et al., 2009), bem como, a ocorrência de amostras G5 e a emergência de G9 (CARDOSO et al., 2000; COSTA et al., 2004; SOUZA et al., 2003).

No que se refere aos genótipos P, observa-se que P[4], P[6] e P[8], são os genótipos mais comumente detectados em humanos, sendo P[4] associado a amostras G2 e P[8] a G1, G3, G4 e G9. Por outro lado, P[6] tem sido visto em associação com qualquer dos genótipos G (G1-G4 e G9), sendo reportado em estudos realizados em todo o mundo, o que mostra a relevância desse genótipo nas infecções por RVA em humanos (SANTOS, HOSHINO, 2005). No Brasil, estudos mostram a ocorrência de P[6] em até 13% das amostras positivas para RVA (ARAÚJO et al., 2001; TIMENETSKY, SANTOS, GOUVEA, 1992) e, na Região Centro-Oeste, um estudo reportou esse genótipo em aproximadamente 16% das amostras caracterizadas, sendo o segundo genótipo mais frequente (SOUZA et al., 2003).

Considerando as associações entre os genótipos G e P, admite-se que dentre aproximadamente 90 associações as mais comumente observadas em amostras provenientes de humanos são G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8] e G9P[8] (BÁNYAI et al., 2012; DÓRÓ et al., 2014; GENTSCH et al., 1996; SANTOS, HOSHINO, 2005).

Em todo o mundo, no período pré-vacina, G1P[8] tem sido a associação predominante (SANTOS, HOSHINO, 2005). Situação que também tem observada no Brasil, incluindo a Região Centro-Oeste (ANDREASI et al., 2007; GURGEL et al., 2008; SANTOS, HOSHINO, 2005; SOUZA et al., 2003). Embora outras associações, como G2P[4] e G9P[8], também tenham contribuído de maneira importante nas infecções por RVA (CARDOSO et al., 2000; COSTA et al., 2004; SANTOS, HOSHINO, 2005).

Por outro lado, estudos conduzidos no período pós-vacina, na Região Centro-Oeste e demais Regiões do Brasil, bem como, em outros países que adotaram uma das vacinas para RVA, mostraram a predominância de amostras G2P[4] sugerindo pressão seletiva exercida pela vacina (ALMEIDA et al., 2015; LINHARES, JUSTINO, 2014; MUNFORD et al., 2009; RAHMAN et al., 2007). Contudo, no mesmo período, investigações conduzidas em países que não utilizavam nenhuma vacina para RVA, também mostraram a predominância dessa associação (AMARILLA et al., 2007; ANTUNES et al., 2009).

Adicionalmente, estudos de monitoramento têm mostrado decréscimo de amostras G2P[4] concomitante à ocorrência de amostras com perfis frequentemente detectados em

humanos, bem como outros menos comuns (DA SILVA SOARES et al., 2014; DULGHEROFF et al., 2012, 2014). Dentre os genótipos relatados no período pós-vacina, destaca-se G12, que embora seja reportado em associação com diferentes genótipos P (RAHMAN et al., 2007), tem sido observado principalmente em associação com P[6] ou P[8] (NEVES et al., 2016; PATTON et al., 2012; RAHMAN et al., 2007). No contexto da vacinação, observa-se aumento crescente na detecção de G12P[8], tanto no Brasil quanto em outros países do mundo (DÓRÓ et al., 2014; LUCHS et al., 2016; MUKHERJEE et al., 2010; NEVES et al., 2016).

Essas informações corroboram a ideia da flutuação temporal de RVA, visto que, em todo o mundo as frequências das associações G e P variam conforme o período e o local de obtenção das amostras, sendo observada a cocirculação de diferentes genótipos de RVA com predominância alternada entre eles (SANTOS, HOSHINO, 2005).

2 JUSTIFICATIVA

Tendo em vista a importância de RVA como agente causador da gastroenterite aguda, principalmente em crianças menores que cinco anos de idade, faz-se necessário a realização de estudos epidemiológicos com intuito de conhecer a diversidade viral, bem como os fatores que contribuem para tal diversidade, com o objetivo de reforçar medidas de prevenção e controle.

Nesse contexto, desde 2006, seguindo preconização da WHO, com vistas à diminuição da morbidade e mortalidade infantil, o Brasil introduziu no PNI a vacina Rotarix[®], a qual é administrada à população infantil. Logo após, a vacina RotaTeq[®] passou a ser usada na rede de saúde privada (MS, 2006; WHO, 2015a).

Estudos realizados em diferentes partes do mundo, incluindo o Brasil, têm ressaltado o decréscimo no índice dos casos graves e hospitalizações por GEA após a implantação das vacinas para RVA, entretanto, o índice de detecção do agente ainda permanece importante, sendo muitas vezes similar aos observados em período pré-vacina (ALMEIDA et al., 2015; BRAECKMAN et al. 2012; DEY et al. 2012; DO CARMO et al. 2011; JUSTINO et al. 2011), demonstrando que a circulação viral é ainda vigente na população infantil.

Adicionalmente, tem-se observado a permanência na circulação dos principais tipos virais considerando os genótipos G e P, muito embora Rotarix[®] e RotaTeq[®] tenham um escopo de prevenção para os principais RVA (G1-G4/P[8]). Entretanto, observa-se que o vírus continua a circular com predominância alternada dos diferentes genótipos ao longo do tempo (DÓRÓ et al., 2014; LUCHS et al., 2016).

Desse modo, tendo em vista a característica segmentada do genoma de RVA e que todas as proteínas codificadas pelos 11 segmentos têm função importante para a manutenção do agente na natureza, é de suma importância o conhecimento da variação ao longo do tempo desses 11 segmentos/proteínas na tentativa de compreender a predominância do vírus na população.

Nesse sentido, diante dos estudos sobre vírus gastroentéricos, incluindo RVA, desenvolvidos desde a década de 1980 pelo grupo de pesquisadores do Laboratório de Virologia Humana do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás LVH/IPTSP/UFG, relativos à detecção e caracterização viral (ALMEIDA et al., 2015; ANDREASI et al.; 2007, 2008; BORGES et al.; 2011;

CARDOSO et al., 1992, 2000, 2001, 2003; COSTA et al., 2004; SOUSA et al., 2012; FREITAS et al., 2008; SANTOS et al., 2007; SILVA et al., 2009; SOUZA et al., 2003; TAVARES et al., 2008a, 2008b), observou-se a necessidade de melhor compreender a diversidade de RVA, tendo como escopo a análise dos 11 segmentos do *dsRNA* viral a partir de amostras detectadas antes e após a introdução da vacina.

Para tanto, o presente estudo propôs investigar a positividade para RVA em crianças com e sem GEA, a partir amostras fecais coletadas no período 2014-2015, bem como, a caracterização molecular dos 11 segmentos de *dsRNA*. A análise também incluiu amostras positivas para RVA previamente identificadas em períodos anteriores, pré e pós-vacina, que se encontravam estocadas no LVH/IPTSP/UFG. Adicionalmente, foi proposta a realização da modelagem molecular das proteínas VP4 e VP7 no intuito de observar possíveis variações nos sítios antigênicos dessas proteínas. No conjunto, há a perspectiva de contribuir para o conhecimento relativo às variações genômica e antigênica de RVA, bem como, para a saúde pública no sentido da prevenção e controle do agente.

3 OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

- Proceder à caracterização genômica de amostras de RVA obtidas de crianças com até cinco anos de idade, detectadas em períodos pré e pós-vacina.

3.2. Objetivos específicos

- Estimar a frequência de RVA em crianças com e sem GEA, com informação ou não de vacina para o vírus, considerando a faixa etária, no período de maio de 2014 a setembro de 2015;
- Determinar a sazonalidade de RVA no período de maio de 2014 a setembro de 2015;
- Caracterizar os genótipos G e P das amostras de RVA detectadas no período de maio de 2014 a setembro de 2015;
- Determinar e comparar as constelações genótípicas de amostras de RVA considerando os 11 segmentos de *dsRNA* obtidas em períodos pré e pós-vacina;
- Proceder à análise filogenética dos 11 segmentos de *dsRNA* de RVA de amostras obtidas antes e após a introdução da vacina;
- Proceder à análise comparativa de nucleotídeos e de aminoácidos deduzidos para cada segmento de *dsRNA* de RVA de amostras obtidas antes e após a introdução da vacina;
- Observar a estrutura tridimensional das proteínas de VP7 e VP4 de RVA inferidas pelas sequências nucleotídicas do *dsRNA* viral.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material de estudo

O material de estudo consistiu em 341 amostras de fezes de crianças com até cinco anos de idade. Do total, seis eram amostras positivas para RVA, sendo provenientes de estudos prévios e detectadas a partir de crianças com GEA, cuja coleta ocorreu entre os anos de 1987 e 2011 (CARDOSO et al., 2000; COSTA et al., 2004; MUNFORD et al., 2009). Essas amostras se encontravam em suspensão a 20% em tampão salina fosfato (PBS – *phosphate buffered saline*) (cloreto de sódio – NaCl, cloreto de potássio – KCl, fosfato de sódio dibásico – Na₂HPO₄, fosfato monobásico de potássio – NaH₂PO₄, pH 7,4) e estocadas a -80°C no LVH/IPTSP/UFG, sendo denominadas de amostras arquivo.

As outras amostras, (n=335) foram provenientes de crianças atendidas no Hospital Materno Infantil de Goiânia-GO no período de maio de 2014 a setembro de 2015. Das 335 amostras (coletadas de igual número de crianças), 134 eram provenientes de crianças com GEA e 201 de crianças assintomáticas para a síndrome. Após coleta as amostras foram transportadas ao LVH/IPTSP/UFG (sob refrigeração) e armazenadas em -20°C até o processamento.

Foi definida como sofrendo GEA, a criança que apresentasse três ou mais evacuações líquidas ou de pouca consistência no período de 24 horas, associada ou não à febre, vômito ou dor abdominal (MS, 2012).

A coleta da amostra fecal foi efetuada após consentimento verbal e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pelo responsável de cada criança, seguido do preenchimento de formulário com dados da criança: pessoais, demográficos, sintomas e de vacinação para o vírus.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás (CEP/HC/UFG) – Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE): 19948113.6.0000.5078.

4.2. Metodologia

4.2.1. Preparo das suspensões fecais

Todas as amostras fecais coletadas no período de maio de 2014 a setembro de 2015 foram processadas para a obtenção de uma suspensão a 20% (PBS) as quais foram divididas em duas alíquotas e estocadas a -20°C até o uso.

4.2.2. Detecção de RVA

Todas as amostras fecais coletadas no período 2014-2015 foram triadas para detecção de RVA através da EGPA. Também as seis amostras arquivo foram novamente triadas pela metodologia para confirmação da positividade da amostra. Pela técnica foi observado também o padrão de bandejamento do *dsRNA* viral.

4.2.2.1. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

A EGPA foi realizada seguindo o procedimento descrito por Pereira e colaboradores (1983), com coloração do gel feita por prata, segundo Herring e colaboradores (1982). A análise dos padrões eletroferotípicos, com base no bandejamento do *dsRNA*, foi procedida de acordo com Lourenço e colaboradores (1981) modificado por Leite e colaboradores (1996).

Para o procedimento, inicialmente, procedeu-se à extração do *dsRNA* viral, pela técnica do fenol/clorofórmio. Resumidamente, a 350 µL do material fecal foi adicionado 50 microlitros (µL) de SDS 10% (sulfato-duodecil-sódio) e a mistura fenol/clorofórmio (1:2) (Invitrogen™/Life Technologies – Foster City, USA). Após centrifugação (12.000 rcf), coletou-se o sobrenadante o qual foi tratado com NaCl a 20% e etanol absoluto gelado (Vetec™ – Rio de Janeiro, Brasil). O material foi incubado a -20°C por 18 horas, centrifugado e adicionado da mistura dissociante (ureia; SDS 10%; 2-mercaptoetanol; Tris (Hidroximetil aminometano/HCl pH6.8; azul de bromofenol 1%). Após, foi submetido à corrente elétrica, tendo como suporte o gel de poliacrilamida (Acrilamida 50%/Bis-acrilamida 30%). A corrida foi feita utilizando cuba vertical contendo tampão Tris/glicina 1X com corrente elétrica de 30 miliampéres (mA) por 2 horas.

A análise do padrão de bandejamento do *dsRNA* foi feita visualmente após procedimentos de fixação do gel (etanol 10%; ácido acético 0,5%), coloração (nitrito de prata 0,01M) e revelação (hidróxido de sódio 3%; formalina 0,76%).

4.2.3. Caracterização das amostras positivas para RVA

A caracterização das amostras de RVA foi feita inicialmente por reação RT-PCR e *multiplex-nested-PCR* para os 11 segmentos de *dsRNA* seguido de sequenciamento genômico.

4.2.3.1. Extração do ácido nucleico viral

O *dsRNA* viral foi extraído utilizando 750 µL de Trizol (InvitrogenTM/Life Technologies – Foster City, USA), que foi adicionado a 250 µL da suspensão fecal. Após incubação foi ao material, 250 µL de clorofórmio (VetecTM – Rio de Janeiro, Brasil), seguindo-se à centrifugação (12.000 rcf/4°C). Posteriormente, aproximadamente 600 µL do sobrenadante foi recolhido. A seguir, o material foi submetido a duas lavagens, sendo a primeira feita com álcool isopropílico absoluto (VetecTM – Rio de Janeiro, Brasil) e, a segunda com etanol 75% (VetecTM – Rio de Janeiro, Brasil), ambos em gelo. Após, o sedimento resultante foi secado e então adicionado de 20 µL de água com dietilpirocarbonato (H₂O-DEPC) (InvitrogenTM/Life Technologies – Foster City, USA), para eluição do *dsRNA* e, armazenado a -20° C até o uso.

4.2.3.2. Genotipagem G (VP7) e P (VP4) por RT-PCR

A caracterização dos genótipos G e P de RVA foi feita por *multiplex-nested-PCR* a partir da transcrição reversa. Para o procedimento foram utilizadas as enzimas MMLV e Taq polimerase (InvitrogenTM/Life Technologies – Foster City, USA) e iniciadores específicos (DAS et al., 1994; GENTSCH et al., 1992; LEITE et al., 1996). A segunda amplificação, para o genótipo G foi feita utilizando protocolos e iniciadores internos previamente descritos (DAS et al., 1994; GOUVEA et al., 1990; LEITE et al., 1996; GOUVEA, SANTOS, TIMENESTSKY, 1994a). Também a genotipagem P foi feita utilizando protocolos e iniciadores anteriormente descritos (GENTSCH et al., 1992; GOUVEA, SANTOS, TIMENESTSKY, 1994b).

4.2.3.3. Sequenciamento genômico dos 11 segmentos *dsRNA*

Para o procedimento inicialmente foi realizada a transcrição reversa para obtenção do DNA complementar (*cDNA – complementary DNA*) dos genes codantes das proteínas estruturais e não estruturais. Foram utilizados 5 μL do *dsRNA* extraído, 1 μL de dimetilsulfóxido (DMSO) e 1 μL de cada iniciador específico para cada segmento genômico (Apêndice I), o que foi seguido da desnaturação ($94^{\circ}\text{C}/10'$ – $50^{\circ}\text{C}/5'$). Após, foi adicionada a mistura de reação contendo, H_2O estéril, solução tampão – Tris-HCl 200 milimolar (mM)/KCl 500 mM, desoxirribonucleotídeos trifosfatados 10mM, cloreto de magnésio 50 mM e a enzima transcriptase reversa – MMLV – 200 unidades (U)/ μL (InvitrogenTM/Life Technologies – Foster City, USA) para volume final de reação de 50 μL . A transcrição reversa foi feita em termociclador SwiftTM Maxi (Esco) ($37^{\circ}\text{C}/60'$ – $94^{\circ}\text{C}/5'$).

Em seguida foi procedida a PCR, utilizando 10 μL de *cDNA* e os mesmos reagentes da transcrição reversa substituído a enzima MMLV pela Taq polimerase (500U/ μL) (InvitrogenTM/Life Technologies – Foster City, USA), bem como os iniciadores específicos, 20 micromolar (μM) cada. A amplificação foi realizada em termociclador SwiftTM Maxi (Esco) conforme descrito (Apêndice II).

A visualização dos produtos amplificados foi feita em gel de agarose a 1,5% contendo 0,5 microgramas por mililitro ($\mu\text{g}/\text{mL}$) de brometo de etídeo, em tampão TBE 5X (Tris/ácido bórico/ácido etilenodiamino tetra-acético – EDTA – *ethylenediamine tetraacetic acid*) e corrente elétrica de 100 volts. Para o procedimento foram utilizados 5 μL do produto, bem como o padrão molecular 100 pb DNA *ladder* (InvitrogenTM/Life Technologies – Foster City, USA), misturados a 1 μL do tampão de corante da amostra (azul de bromofenol; xilenocianol; glicerol). A análise da corrida eletroforética foi feita em transluminador ultravioleta (Vilbert Loumart).

A reação de sequenciamento foi realizada de acordo com Sanger et al., (1977) utilizando o kit BigDyeTM Direct Cycle Sequencing (Applied BiosystemsTM, USA). Para o procedimento, os produtos amplificados foram precipitados com isopropanol 65% (MerckTM – Darmstadt, Germany), lavados com etanol 70% (MerckTM – Darmstadt, Germany) e ressuspensos em 20 μL de H_2O estéril. Após, 2 μL dos produtos foram submetidos à corrida eletroforética em gel de agarose 1,5%, tendo como parâmetro o padrão molecular 100 pb DNA *ladder* (InvitrogenTM/Life Technologies – Foster City,

USA), para a certificação do produto amplificado. Em seguida, a cada produto (3 μL), para um volume final de 10 μL , foi adicionado o iniciador específico, senso ou anti-senso 2 μM , solução tampão do kit de sequenciamento e dideoxinucleotídeos. A qualidade da reação foi garantida pela utilização do controle interno do kit, sendo utilizada para a amplificação a seguinte ciclagem – 95°C/10” – 95°C/20”, 45-60°C/15”, 60°C/1’ – 25 ciclos, com destaque para as temperaturas de anelamento, que variaram conforme o iniciador utilizado.

O procedimento seguinte incluiu lavagens do material com isopropanol 65% e etanol 60% (Merck™ – Darmstadt, Germany), seguido de secagem (95°C/2’) e desnaturação com 10 μL de formamida (ThermoFischer Scientific™, USA) (95°C/5”). A reação foi processada em Sequenciador Automático ABI Prism3130 (Applied Biosystems™, USA).

A análise de qualidade dos eletroferogramas e geração das sequências consensos foram feitas utilizando o programa Phred/Phrap/Consed, sendo o parâmetro de qualidade para cada base definido como PHRED igual ou superior a 20 (EWING, GREEN, 1998; EWING et al., 1998; GORDON, ABAJIAN, GREEN, 1998; GORDON, DESMARAIS, GREEN, 2001).

4.2.3.4. Análises filogenética e de identidade

Amostras, cujos 11 segmentos de *dsRNA* puderam ser sequenciados foram submetidas às análises filogenética e comparativa de identidade nucleotídica e de aminoácidos. Para as análises, foram utilizadas sequências de amostras depositadas no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov) através do programa BLAST (ALTSCHUL et al., 1990), sendo utilizado para o alinhamento das sequências, o programa CLUSTALX (THOMPSON et al., 1997) e, para edição, o programa JALVIEWv.2 (WATERHOUSE et al., 2009). A determinação do melhor modelo evolutivo foi feita utilizando o programa JMODELTESTv.2.1.2.10 (DARRIBA et al., 2012). As árvores filogenéticas foram construídas pelo método da verossimilhança com o programa MEGA7 (KUMAR, STECHER, TAMURA, 2016). A matriz de identidade para cada conjunto de sequências foi obtida utilizando o programa BIOEDITv.7.2.5 (HALL, 1999).

4.2.3.5. Caracterização de RVA

A caracterização em genótipos foi feita utilizando a ferramenta RotaCv.2.0 disponibilizada na plataforma *on-line* do RCWG (MAES et al., 2009) para sequências de no mínimo 500 pb e, as de menor tamanho foram caracterizadas manualmente por análise filogenética. Pelo procedimento procedeu-se à definição de genogrupos e linhagens das amostras.

4.2.4. Modelagem molecular

O procedimento foi feito utilizando o servidor I-Tasser (ZHANG, 2008), sendo baseado na homologia estrutural de VP7 e VP4 com estruturas cristalográficas de RVA disponíveis no banco de dados de proteínas (*PDB – Protein Data Bank*). A construção da estrutura de VP7 (ID 3FMG, resolução de 3,50 Å) (AOKI et al., 2009) foi feita a partir da cadeia A e para VP4 foi utilizado como modelo a cadeia X (ID 3IYU, resolução de 3,80 Å) (SETTEMBRE et al., 2011).

A Dinâmica Molecular, realizada com o intuito de avaliar a estabilidade conformacional e variabilidade dos modelos iniciais, foi realizada a partir de simulações utilizando o programa Gromacs 5.1.3 (BERENDSEN et al., 1995; PÁLL et al., 2015), usando campo de força AMBER99SB-ILDN (LINDORFF-LARSEN et al., 2010). Para o procedimento, os resíduos de aminoácidos 1-65 e 225-776 foram removidos do modelo VP4 os quais estão localizados nas regiões VP5*A e VP5*B que não foram comparadas nesse estudo, bem como, os resíduos 258-312 do modelo VP7. O refinamento dos modelos foi feito utilizando protocolo previamente descrito (BENEDITO et al. – dados não publicados; COSTA et al., 2015; PRADO et al., 2014).

A solvatação das proteínas foi feita em caixa cúbica com distância de 10 angstroms (Å) entre suas faces utilizando o modelo TIP3P (MAHONEY, JORGENSEN, 2000), sendo o sistema neutralizado pela adição de contra-íons, em número variado, conforme requerido para cada proteína. As interações eletrostáticas foram avaliadas utilizando o método Ewald (DARDEN, YORK, PEDERSEN, 1993) em condições periódicas de contorno considerando os limites da caixa. O sistema foi submetido à minimização de energia e as simulações foram concluídas quando a tolerância de 1000 kJ/mol não foi excedida. A simulação final foi feita na ordem de 100 nanosegundos (ns) (10^{-12} s) para

todas as proteínas à temperatura constante de 300 Kelvin (K), pressão de 1 atmosfera (atm), com passos de 2 femtosegundos (fs) (10^{-15} s) e sem restrição da conformação das proteínas.

Todas as informações referentes à trajetória desses tempos foram coletadas a cada 50 picosegundos (ps) (5×10^{-13} s). O equilíbrio da trajetória foi avaliado pelo monitoramento de parâmetros, tais como, o desvio médio quadrático (*RMSD – root mean square deviation*) dos átomos não hidrogênio, energia total, energia potencial e energia cinética. Os valores de RMSD entre as estruturas finais e os modelos auxiliaram na identificação dos segmentos comuns correspondentes às regiões conservadas.

Para determinação das melhores conformações representativas das estruturas das proteínas foi utilizado o programa *g_cluster* (BERENDSEN et al., 1995; PÁLL et al., 2015), sendo utilizado o algoritmo *gromos* conforme descrito (DAURA et al., 1999). O ponto de corte para os *clusters* foi igual a 0,3 nm considerando o perfil RMSD de cada proteína. Os *clusters* foram determinados usando valores de RMSD dos átomos não hidrogênio. A qualidade das estruturas previstas foi avaliada utilizando o servidor MolProbity (CHEN et al., 2010), sendo selecionadas as estruturas com valores próximos a zero (Apêndice III).

4.2.5. Análise estatística

A positividade para RVA considerando os dados demográficos e pessoais das crianças estudadas no período 2014-2015, foi analisada pelo programa EPIINFOv.7 utilizando o teste qui-quadrado (χ^2) com intervalo de confiança de 95%.

5 RESULTADOS

5.1. Detecção de RVA

Dentre as 335 amostras coletadas no período de maio de 2014 a setembro de 2015, nove (2,7%) foram positivas para RVA, sendo verificada positividade de 6,0% (8/134) para crianças com GEA e de 0,5% (1/201) para crianças assintomáticas (Tabela 1). Por EGPA todas as amostras apresentaram padrão longo com o perfil eletroferotípico “bbga” (dado não mostrado).

Análise da positividade para RVA considerando faixa etária e sazonalidade mostrou maior índice de detecção para crianças com idade entre 37 e 60 meses, sendo ainda observada a ocorrência do vírus em ambas as estações climáticas, embora em maior número na estação chuvosa ($p>0,05$) (Tabela 1).

Tabela 1. Positividade para RVA a partir de crianças hospitalizadas em relação à faixa etária, presença ou não de GEA e estação climática – 2014-2015.

	Positivos/Total de examinados	Percentual (%)
Faixa etária (meses)*		
0-6*	1/129	0,8
7-12	2/56	3,6
13-24	2/66	3,3
25-36	0/44	0,0
37-60*	4/40	10,0
GEA**		
Sim	8/134	6,0
Não	1/201	0,5
Estação climática***		
Seca (abril-agosto)	3/171	1,7
Chuvosa (setembro-março)	6/164	3,6

* $\chi^2 = 6,12$ $p=0,01$; ** $\chi^2 = 7,23$ $p=0,007$; *** $\chi^2 = 0,54$ $p=0,45$

Considerando informação relativa à vacinação para RVA, de 211 (63,0%) crianças houve relato de vacina, sendo observado que das oito crianças positivas com quadro de GEA, cinco, apresentavam essa informação e que a única criança sem GEA, positiva para RVA, não tinha informação de vacina (dado não mostrado).

5.2. Genotipagem G (VP7) e P (VP4) de amostras positivas para RVA

A genotipagem G e P foi realizada para 15 amostras de RVA, das quais seis eram amostras arquivo e, nove eram provenientes de crianças no período 2014-2015. Das seis amostras arquivos, cinco foram obtidas do período pré-vacina, das quais quatro foram caracterizadas como G1P[8] e a outra como P[8]. A amostra do período pós-vacina foi caracterizada como G1P[8]. Em adição, dentre as nove amostras obtidas no período 2014-2015, sete puderam ser caracterizadas para G e/ou P, sendo quatro G12P[8], uma G12 e duas P[8] (Tabela 2).

Tabela 2. Genótipos G (VP7) e P (VP4) de RVA considerando a data da coleta das amostras fecais.

	Amostra fecal	Data de coleta	Genótipos G/P
Amostras arquivo			
	17220	03/08/1998	G1P[8]
	27544	16/06/2001	P[8]
	27784	20/06/2001	G1P[8]
	27821	27/06/2001	G1P[8]
	3003	30/08/2005	G1P[8]
	3088*	31/07/2006	G1P[8]
Amostras do período 2014-2015			
	33555	28/07/2014	G12P[8]
	33576	13/08/2014	G12
	33588	21/08/2014	NT
	33610	11/09/2014	G12P[8]
	33616	24/09/2014	P[8]
	33624	30/09/2014	G12P[8]
	33738	27/02/2015	G12P[8]
	33742	06/03/2015	NT
	33848	30/09/2015	P[8]

*Amostra coletada no período pós-vacina; NT – não genotipável para G ou P.

5.3. Genotipagem dos 11 segmentos de *dsRNA* de RVA

A genotipagem para RVA dos 11 segmentos de RNA genômico foi possível para três amostras: 3003/2005/G1P[8] (período pré-vacina), 3088/2006/G1P[8] (período pós-vacina) e 33610/2014/G12P[8] (período pós-vacina), sendo que todas apresentaram a constelação genotípica de genogrupo I (Tabela 3).

Tabela 3. Constelação genotípica das amostras de RVA obtidas nos períodos pré e pós-vacina.

Período	Amostra	Constelação genotípica
Pré-vacina	3003/2005/G1P[8]	G1-P[8]-I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1
Pós-vacina	3088/2006/G1P[8]	G1-P[8]-I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1
	33610/2014/G12P[8]	G12-P[8]-I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1

5.4. Análise filogenética

A análise filogenética foi procedida para os 11 segmentos genômicos, sendo possível a caracterização em linhagens a partir das sequências codantes dos segmentos de VP7, VP4, VP6 e NSP4. Para o segmento codante de VP7, foi observado que as amostras 3003/2005/G1P[8] e 3088/2006/G1P[8], pertencem às linhagens II e I, respectivamente, e a amostra 33610/2014/G12P[8], à linhagem III. Em relação ao segmento genômico codante de VP4, as três amostras P[8] foram identificadas como linhagem III. Para o segmento codante de VP6 foi observado que a amostra do período pré-vacina 3003/2005/G1P[8] era linhagem IV e, as amostras do período pós-vacina, 3088/2006/G1P[8] e 33610/2014/G12P[8], eram linhagem I. Com relação ao segmento codante de NSP4 foi observado que as três amostras pertencem a linhagem III (Apêndice IV).

Considerando os segmentos genômicos codantes das proteínas VP1-3, NSP1-3 e NSP5, foi observada a formação de grupamentos com amostras do Brasil e de outros países do mundo, não sendo possível a caracterização das linhagens (Apêndice IV).

5.5. Análise comparativa de identidade nucleotídica e de aminoácidos

A análise comparativa entre as duas amostras G1P[8] mostrou alta identidade nucleotídica/aminoácidos (>80%), o mesmo ocorrendo quando se procedeu à comparação de ambas as amostras com a amostra vacinal (Rotarix®) e, amostras de outras partes do mundo. Ainda, análise comparativa dos epítomos antigênicos de VP7, mostrou que G1 da amostra 3003/2005/G1P[8] (período pré-vacina) apresentou 100% de identidade em relação à vacina Rotarix®, enquanto a amostra 3088/2006/G1P[8] (período pós-vacina) apresentou mutações pontuais para os epítomos 7-1a, 7-1b e 7-2. A amostra 33610/2014/G12P[8] (período pós-vacina) mostrou menor identidade nucleotídica

(<70%) e de aminoácidos (<80%), além de maior quantidade de mutações nos epítomos antigênicos de VP7 (Apêndice V; Figura 8).

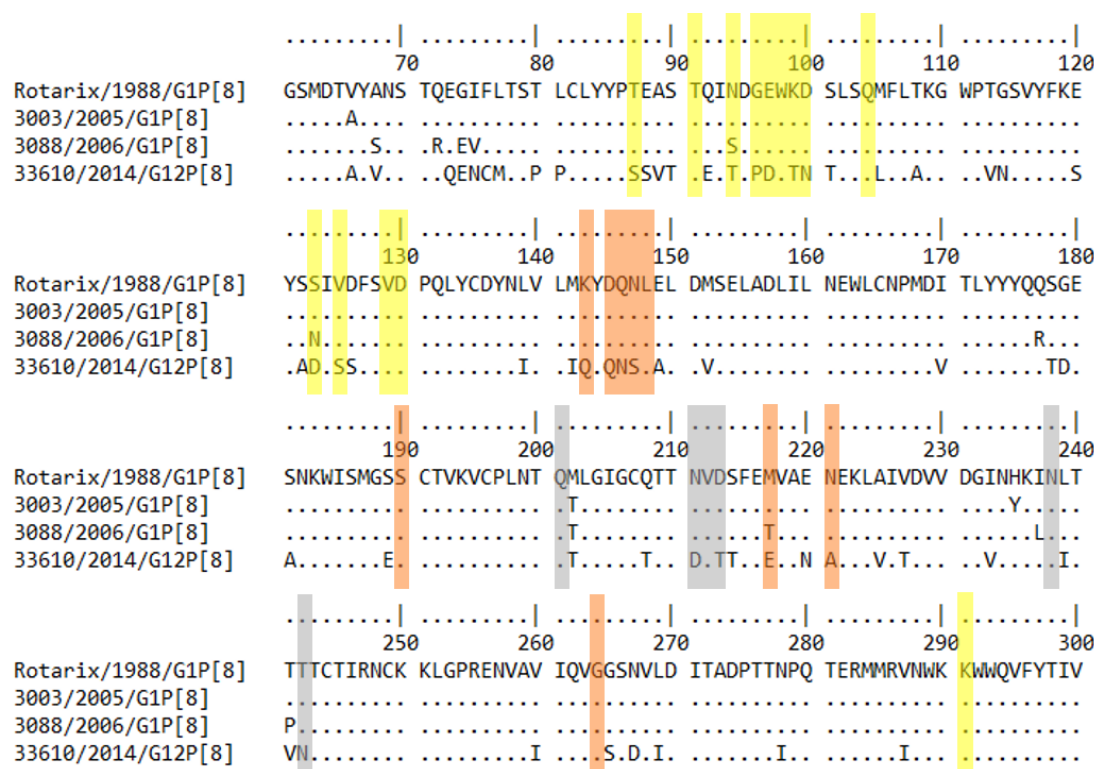


Figura 8. Alinhamento dos resíduos de aminoácidos da proteína VP7 da vacina Rotarix® com as amostras dos períodos pré e pós-vacina. Epítomos antigênicos: 7-1a – amarelo; 7-1b – cinza; 7-2 – laranja.

Com relação a VP4 foi observado 100% de identidade nos epítomos 8-2 e 8-4 entre as amostras G1P[8] dos períodos pré e pós-vacina, bem como da amostra G12P[8], em relação à vacina Rotarix®. Adicionalmente foram observadas mutações idênticas nos epítomos 8-1 e 8-3, quando da comparação entre as amostras G1P[8], dos períodos pré e pós-vacina e de G12P[8] com a amostra vacinal (Apêndice V; Figura 9).

Para VP6 foi observado identidade nucleotídica >80% e identidade de aminoácidos variável de 90-100%, enquanto para NSP4 foi vista identidade nucleotídica/aminoácidos >90%. Considerando os segmentos codantes de VP1-3, NSP1-3 e NSP5/6 foi observado identidade nucleotídica/aminoácidos >80% (Apêndice V).

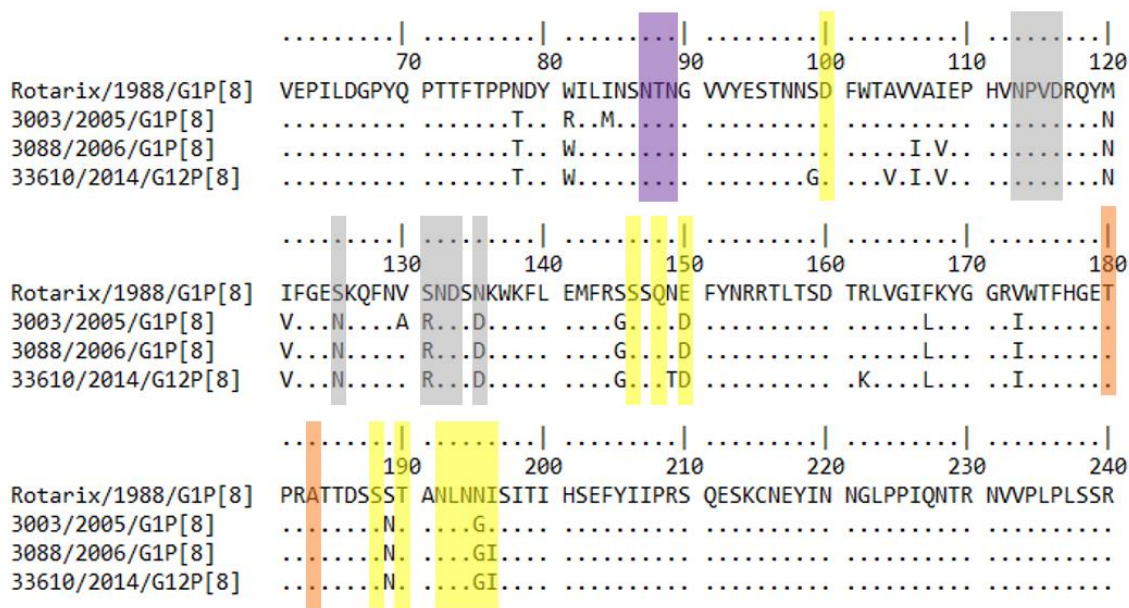


Figura 9. Alinhamento dos resíduos de aminoácidos da proteína VP4 da vacina Rotarix® com as amostras dos períodos pré- e pós-vacina. Epítomos antigênicos de VP4: 8-1 – amarelo; 8-2 – laranja; 8-3 – cinza; 8-4 – violeta.

5.6. Modelagem molecular

A análise comparativa entre os modelos construídos para VP7 e a estrutura proteica disponível no banco de dados (UniProt C3RX25) mostrou que a amostra 3003/2005/G1P[8] (período pré-vacina) apresenta conservação nos epítomos antigênicos (7-1a, 7-1b e 7-2), sendo observadas modificações para as amostras 3088/2006/G1P[8] e 33610/2014/G12P[8] do período pós-vacina (Figuras 10, 11 e 12).

Dentre as amostras do período pós-vacina foram observadas maiores diferenças estruturais para a amostra 33610/2014/G12P[8], no epítomo 7-2, em torno do resíduo 146. Nessa região, a diferença RMSD entre os aminoácidos está acima 10Å (Apêndice VI) a qual é maior em relação às demais (RMSD = 6.61Å).

A modelagem para VP4 mostrou a ocorrência de substituições nos epítomos 8-1 e 8-2 (Figuras 11, 12 e 13) em comparação ao modelo (UniProt C3RX20), assim como visto para VP7, as maiores mudanças foram observadas para a amostra 33610/2014/G12P[8] no epítomo antigênico 8-1 (Figura 14). As diferenças de RMSD entre os *clusters* mostrou variação máxima de 4.0Å, sendo observado que a maioria das flutuações ocorreu nos resíduos 125, 135, 98 e 106, os quais são envolvidos em estruturas em dobra (Apêndice VI). Ademais, aproximadamente 11% das hélices e folhas foram

convertidas em *loops* e em outras estruturas. Essas diferenças foram menos pronunciadas na amostra 3003/2005/G1P[8] (período pré-vacina) (Figura 15). Para ambas as estruturas, a diferença principal consistiu na perda de conteúdo da folha.

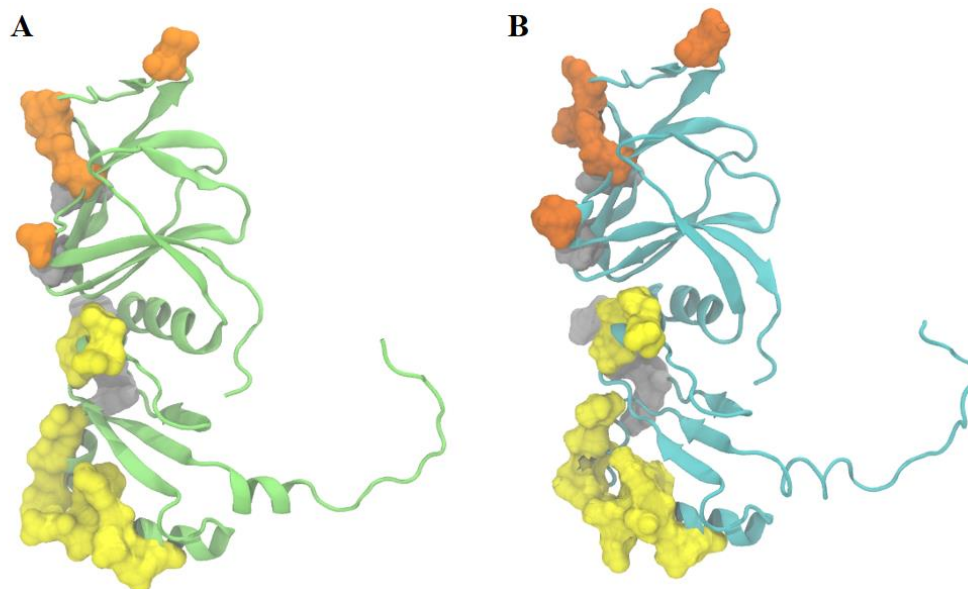


Figura 10. Estrutura 3D RVA-VP7: A. Modelo de VP7 (UniProt C3RX25); B. Amostra 3003/2005/G1P[8]. Epítomos antigênicos de VP7: 7-1a – amarelo; 7-1b – cinza; 7-2 – laranja.

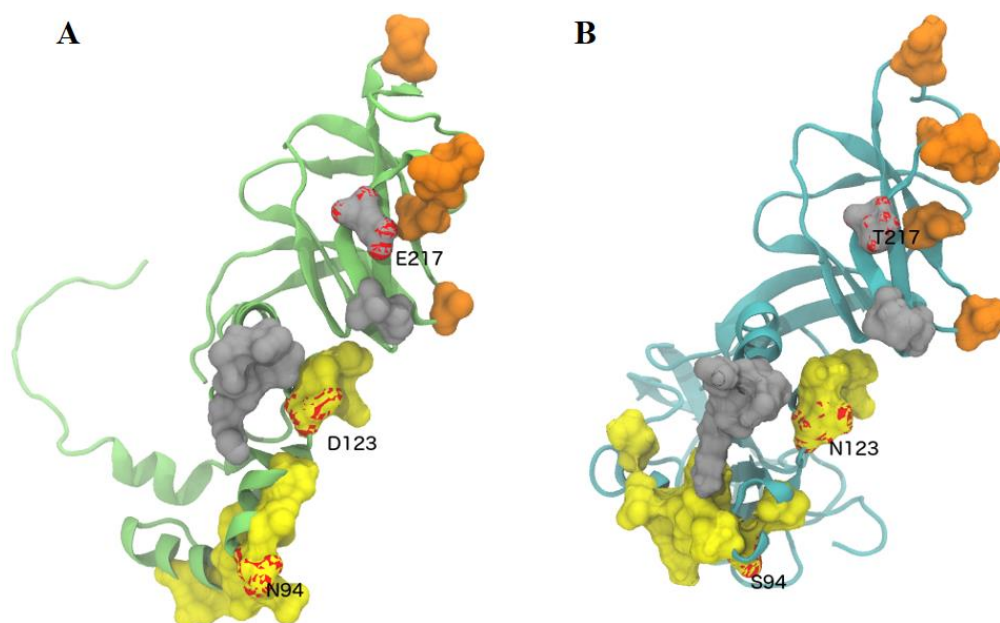


Figura 11. Estrutura 3D RVA-VP7: A. Modelo de VP7 (UniProt C3RX25); B. Amostra 3088/2006/G1P[8]. Epítomos antigênicos de VP7: 7-1a – amarelo; 7-1b – cinza; 7-2 – laranja.

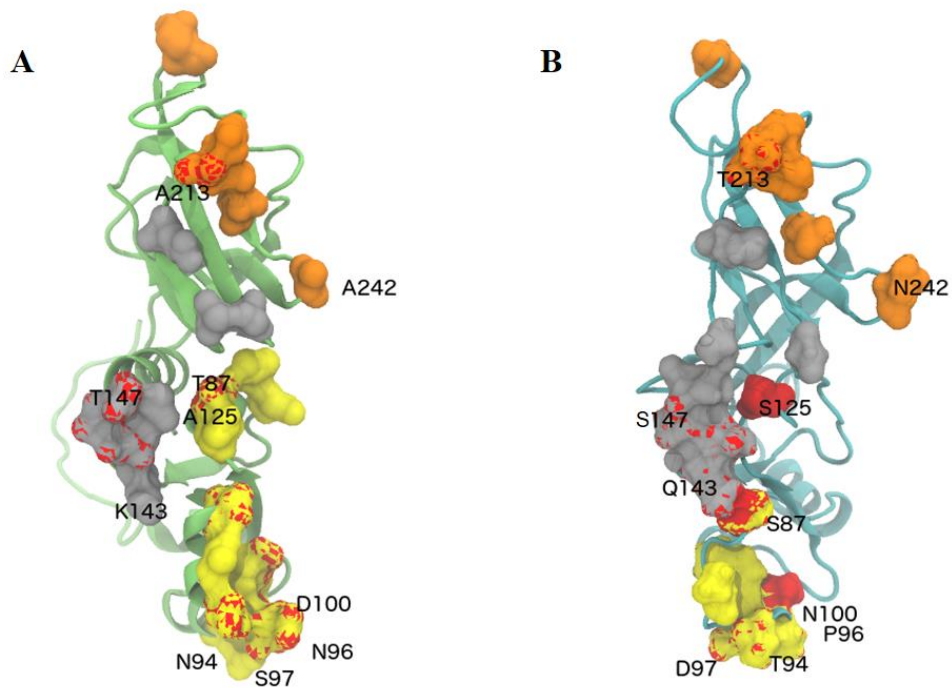


Figura 12. Estrutura 3D RVA-VP7: A. Modelo de VP7 (UniProt C3RX25); B. Amostra 33610/2014/G12P[8]. Epítomos antigênicos de VP7: 7-1a – amarelo; 7-1b – cinza; 7-2 – laranja.

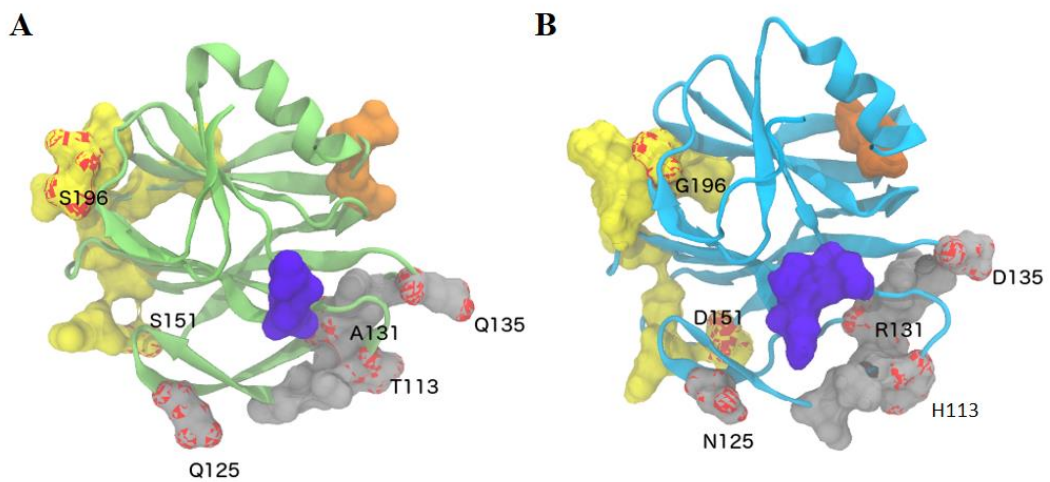


Figura 13. Estrutura 3D RVA-VP4: A. Modelo de VP4 (UniProt C3RX20); B. Amostra 3003/2005/G1P[8]. Epítomos antigênicos de VP4: 8-1 – amarelo; 8-2 – laranja; 8-3 – cinza; 8-4 – violeta.

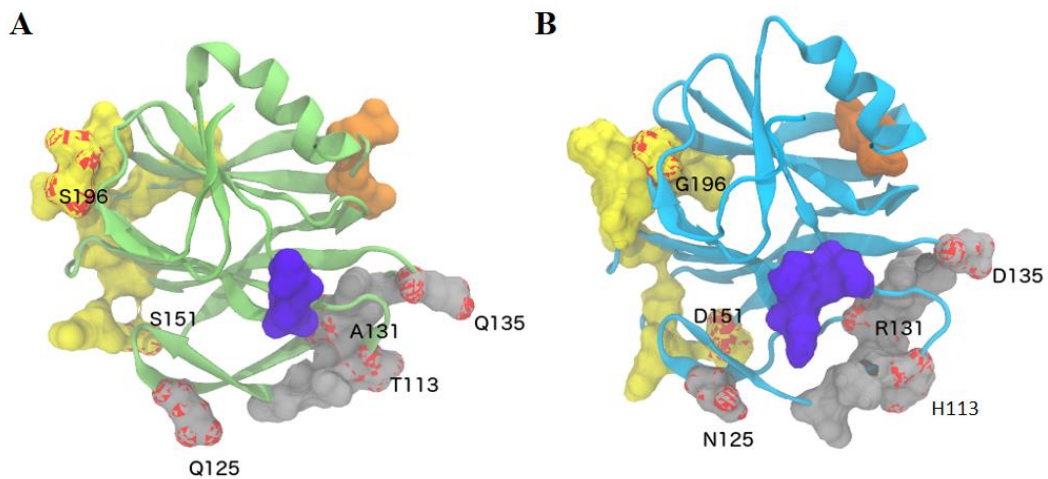


Figura 14. Estrutura 3D RVA-VP4: A. Modelo de VP4 (UniProt C3RX20); B. Amostra 3088/2006/G1P[8]. Epítapos antigênicos de VP4: 8-1 – amarelo; 8-2 – laranja; 8-3 – cinza; 8-4 – violeta.

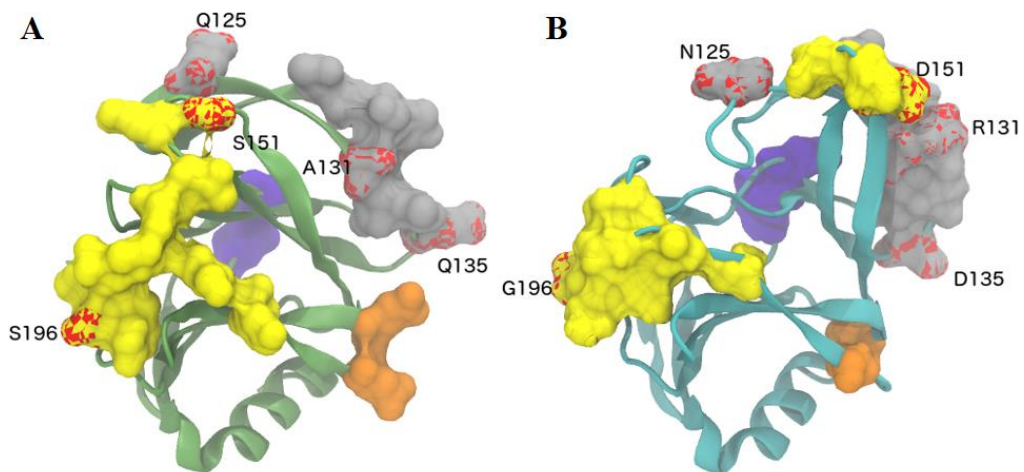


Figura 15. Estrutura 3D RVA-VP4: A. Modelo de VP4 (UniProt C3RX20); B. Amostra 33610/2014/G12P[8]. Epítapos antigênicos de VP4: 8-1 – amarelo; 8-2 – laranja; 8-3 – cinza; 8-4 – violeta.

6 DISCUSSÃO

Rotavírus A é importante agente etiológico de GEA, principalmente, em crianças com até cinco anos de idade (WHO, 2015a). Assim, tendo em vista o impacto das infecções causadas por esse vírus, diferentes vacinas têm sido elaboradas e, dessas, duas estão em uso no Brasil (MS, 2006). Nesse contexto, considerando o impacto negativo da doença causada por RVA, estudos têm sido conduzidos no sentido de monitorar a sua circulação na população humana após a implementação das vacinas, em diferentes países (DESAI et al., 2011; KARAFILLAKIS, HASSOUNAH, ATCHISON, 2015; PATERNINA-CAICEDO et al. 2015; TATE et al., 2013; PATH, 2016), incluindo o Brasil (DÓRÓ et al., 2014; JUSTINO et al., 2011; LINHARES, JUSTINO, 2014; LUCKS et al., 2015; MUNFORD et al., 2009).

Nesse sentido, os estudos vêm mostrando redução das hospitalizações por GEA, bem como nos índices de detecção de RVA (LINHARES, JUSTINO, 2014). Não obstante, RVA continua a circular na população infantil, sendo observado a ocorrência dos mesmos genótipos detectados em período pré-vacina, além da emergência de outros genótipos, alguns menos comuns (LUCKS et al., 2015).

No presente estudo foi observado índice de positividade de 2,7% para RVA, o que pode ser considerado inferior a outros obtidos em estudos prévios realizados na região Centro-Oeste, que variam de 11,8% a 41,8%, tanto em período pré-vacina quanto em período pós-vacina, embora o estudo tenha sido realizado em período próximo à inclusão desta ao PNI brasileiro (ALMEIDA et al. 2015; ANDREASI et al., 2007; CARDOSO et al., 1992, 2000, 2003; CARVALHO-COSTA et al., 2006; MUNFORD et al., 2009).

Fato similar também tem sido observado em outras regiões brasileiras (CARVALHO-COSTA et al., 2009; DOMINGUES et al., 2008; DULGHEROFF et al., 2012, 2014; GURGEL et al., 2009; LINHARES, BRESSE, 2000; MUNFORD et al., 2007, 2009; SERRAVALLE et al., 2007) e nos EUA onde, estudo que contemplou a análise de amostras coletadas entre 2007 e 2014, mostrou índices de detecção de RVA de 1,7% a 12,5%, dependendo da região, com menores índices para amostras obtidas em 2013 e 2014 (ALIABADI et al., 2015).

Considerando o baixo índice de positividade para o vírus observado nesse estudo, admitimos, em concordância à literatura, que esse pode ser relacionado à ampla cobertura vacinal para o agente em todo o país, sendo superior a 90% na região Centro-Oeste (MS,

2016). Adicionalmente, deve-se considerar o efeito de imunidade de grupo, também referida como imunidade de rebanho (*herd immunity*), visto que a vacinação massiva reduz o número de indivíduos suscetíveis e, por conseguinte, de transmissores do agente (FINE, EAMES, HEYMANN, 2011; MAST et al., 2015; POLLARD et al., 2015).

Por outro lado, embora o benefício da diminuição da ocorrência viral, foi observado que RVA continua a circular na Região, tanto em criança sintomática quanto em assintomática. Esse fato pode estar relacionado com a capacidade da vacina de induzir imunidade heterotípica diferencial em relação aos genótipos constituintes da mesma (FLANNERY et al., 2013).

Considerando a faixa etária, foi observado maior índice de positividade para RVA em crianças com idade superior a 36 meses, o que difere de estudos prévios realizados na Região Centro-Oeste e em outras partes do Brasil e mesmo em outros países uma vez que a faixa predominante era considerada em até 24 meses (GOUVEA et al., 2007; SILVA et al., 2013; WIERZBA et al., 2006). Sugere-se que essa mudança no padrão etário para infecção por RVA possa resultar do aumento do número de crianças susceptíveis em faixa etária superior a 24 meses de idade resultante do escape vacinal, da não vacinação em idade apropriada ou pela realização de esquema vacinal incompleto.

Em adição, RVA circulou durante todo o ano com maior número de amostras positivas na estação chuvosa que, embora não significativo, parece indicar uma mudança na característica de circulação de RVA na Região Centro-Oeste, onde tem sido observado predominância da positividade na estação de seca (CARDOSO et al., 2000). Situação semelhante também tem sido relatada por estudo de monitoramento realizado em todas as regiões do Brasil (DULGHEROFF et al., 2012; LUCHS et al., 2016). Em adição, essa alteração no padrão sazonal de RVA foi reportada por estudos realizados nos EUA e na Bélgica logo no início do processo de vacinação para RVA (BRAECKMAN et al., 2011; TATE et al., 2011). Admite-se que esse fato possa estar associado ao processo vacinal pois a dinâmica epidêmica do vírus depende da existência de indivíduos suscetíveis, assim, com a vacinação em massa o número desses indivíduos decresce o que pode resultar no atraso do início da atividade de RVA (CURNS et al., 2011).

No presente estudo, todas as amostras de RVA obtidas no período 2014-2015, apresentaram padrão eletroferotípico longo, assim como as amostras arquivo, dos períodos pré e pós-vacina. Esse dado corrobora estudos anteriores realizados na Região Centro-Oeste, onde foi observado predominância desse padrão de amostras em ambos os

períodos (ALMEIDA et al., 2015; CARDOSO et al., 2000; MUNFORD et al., 2007). Ademais, estudos realizados em outras regiões do Brasil e, em outros países mostram resultado similar, muito embora relatem a ocorrência de padrões curto e supercurto em ambos os períodos (AHMED, NAKAGOMI, NAKAGOMI, 2007; SILVA et al., 2013; SOARES et al., 2010).

Nessa investigação, as amostras arquivos, bem como as amostras obtidas no período 2014-2015, foram submetidas à genotipagem por *multiplex-nested-PCR* e por sequenciamento genômico. Contudo, somente poucas amostras puderam ser caracterizadas para os 11 segmentos. Essa limitação pode estar relacionada ao fato do RNA viral ser extraído diretamente das amostras de fezes, as quais podem conter inibidores que podem interferir no processo de amplificação durante a PCR (GOUVEA et al., 1990). Admite-se ainda, que o baixo título viral de algumas amostras também possa contribuir para a dificuldade na caracterização do *dsRNA* genômico (ALFIERI et al., 2006). Ademais, deve-se considerar que variabilidade genômica pode resultar em modificações no sítio de inserção dos iniciadores (ALADIN et al., 2010; MELO et al., 2013).

Considerando as amostras do período 2014-2015 foi observado a ocorrência de amostras G12P[8], assim como reportado por outros estudos realizados no Brasil e em outras partes do mundo (DÓRÓ et al., 2014; LUCHS et al., 2015, 2016). O genótipo G12 foi inicialmente detectado nas Filipinas no final dos anos 80 e, após mais de uma década, sua circulação foi observada nos EUA, Tailândia e países da Ásia (GRIFFIN et al., 2002; PONGSUWANNA et al., 2002; TANIGUCHI et al., 1990). Posteriormente, G12 foi detectado em outros países com a associação G12P[8], sendo reportada em período pós-vacina, inclusive no Brasil, o que sugere a emergência desse genótipo (KIRKWOOD, ROCZO-FARKAS, 2015; NEVES et al., 2016; WYLIE, WEINSTOCK, STORCH, 2015).

A emergência de G12P[8] na Região Centro-Oeste após quase dez anos da introdução de Rotarix® ao PNI brasileiro, pode ser comparado à re-emergência de G2P[4], observado logo após a implantação da vacina (2007-2010) (ALMEIDA et al., 2015; MUNFORD et al. 2009). Essa situação também foi vista em outras regiões brasileiras (CARVALHO-COSTA et al., 2009; DULGHEROFF et al., 2012; LUCHS et al., 2016), bem como, em outras partes do mundo (SNELLING et al., 2011; O'RYAN, LUCERO,

LINHARES, 2011), o que demonstra o alto potencial de alternância de genótipos do agente no decorrer do tempo.

A análise dos 11 segmentos de *dsRNA*, das amostras dos períodos pré e pós-vacina, mostrou que as três amostras apresentam constelação genotípica característica de genogrupo I (I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1). A associação entre G1P[8] e os genótipos 1 dos demais segmentos de *dsRNA* representa a configuração típica de genogrupo I, conforme observado em diferentes estudos (MATTHIJNSSENS et al. 2011; MCDONALD et al., 2012). Por outro lado, G12 tem sido associado não só com P[8], mas também com P[4], P[6] ou P[9], bem como com outros genótipos P, podendo ser caracterizada como qualquer um dos três genogrupos (I, II e III) (IDE et al., 2015; MATTHIJNSSENS et al., 2010; RAHMAN et al., 2007).

Considerando a análise filogenética foi observado que a amostra G1P[8] do período pré-vacina pertence à linhagem II, a mesma da vacina Rotarix® (ZELLER et al., 2012), e a amostra do período pós-vacina, à linhagem I. Esse dado reforça estudo prévio realizado na Região Centro-Oeste (ALMEIDA et al., 2015), muito embora outros estudos provenientes de diferentes partes do mundo, incluindo o Brasil, tenham observado a circulação concomitante de ambas as linhagens nos períodos pré e pós-vacina (CARMONA, 2010; ABDEL-MONEIM et al., 2015).

Adicionalmente, foi observado que a amostra G12P[8] pertence à linhagem III, o que corrobora outros estudos realizados em diferentes países, incluindo o Brasil (DELOGU et al., 2015; MATTHIJNSSENS et al., 2009; NEVES et al., 2016; RAHMAN et al., 2007). Estudos de filogenia mostram que o genótipo G12 comporta quatro linhagens (I-IV) (GHOSH et al., 2006; KOBAYASHI et al., 1989; MATTHIJNSSENS et al., 2009), com a linhagem I sendo representada por amostras G12P[4] (KOBAYASHI et al., 1989), a II por amostras G12P[9] (MATTHIJNSSENS et al., 2009), a III por amostras G12P[8] e G12P[6] (DELOGU et al., 2015; MATTHIJNSSENS et al., 2009; NEVES et al., 2016; RAHMAN et al., 2007) e a IV pela amostra G12P[7], de origem suína (GHOSH et al., 2006).

A análise comparativa de nucleotídeos e aminoácidos de VP7, mostrou alta identidade entre as duas amostras G1P[8], bem como com a amostra vacinal (>80%), enquanto a amostra G12P[8], apresentou menor identidade nucleotídica (<70%) e de aminoácidos (<80%), tanto em comparação às amostras G1 quanto à amostra vacinal, o que foi evidenciado pela observação de variações nos epítomos antigênicos de VP7. Esses

dados são similares aos de outros estudos no que se refere à variação de aminoácidos nos epítomos antigênicos, o que pode contribuir para o escape da imunidade vacinal e, por conseguinte, na emergência de novos genótipos e/ou variantes genotípicas na população humana (DELOGU et al., 2015; WYLIE, WEINSTOCK, STORCH, 2015).

Similarmente, para o genótipo P[8] (VP4) foi observado que as três amostras pertencem à linhagem III e que apresentaram entre si, com outras amostras depositadas e com a amostra vacinal, identidade nucleotídica e de aminoácidos >80%. Esses dados são corroborados por outros estudos realizados no Brasil e em outras partes do mundo (NEVES et al., 2016; RAHMAN et al., 2007; IANIRO et al., 2016; MOROZOVA et al., 2015). Nesse contexto, sugere-se que essa conservação possa estar relacionada a baixa pressão seletiva exercida sobre o segmento codante de VP4.

Considerando o segmento codante de VP6 observou-se que a amostra 3003/2005/G1P[8] do período pré-vacina pertence à linhagem IV e as demais amostras (3088/2006/G1P[8] e 33610/2014/G12P[8]) à linhagem I. Esse dado foi evidenciado pela análise comparativa de nucleotídeos que, embora considerada alta (>80%) possibilitou a diferenciação em linhagens. Não obstante quando feita a análise dos resíduos de aminoácidos, foi observado identidade de 90% a 100%, o que sugere ocorrência de mutações sinônimas.

Em termos de NSP4 foi observado que as amostras de ambos os períodos pertencem à linhagem III, com alta identidade nucleotídica e de aminoácidos (>90%), o que parece indicar conservação do segmento codante e, similar a VP6, a ocorrência de mutações sinônimas (ITURRIZA-GÓMARA et al., 2001, 2003; WOROBEY, HOLMES, 1999).

Para os demais segmentos de *dsRNA* genômico codantes das proteínas VP1-VP3, e NSP1-NSP3 e NSP5, não foi possível a determinação das linhagens, porém, foi observado a formação de grupamentos com amostras pertencentes ao genogrupo I (*Wa-like*) do Brasil e de outros países do mundo tal como reportado por outra investigação (SILVA et al., 2015). Essa limitação pode estar associada ao tamanho do fragmento utilizado na análise e às diferenças nos tamanhos das sequências das amostras de referência empregadas na análise filogenética.

Considerando a modelagem molecular foi observado que a amostra G12P[8] do período pós-vacina apresentou maiores mudanças nos epítomos antigênicos de VP7 (7-2) e de VP4 (8-1), do que as G1P[8] dos períodos pré e pós-vacina. Sugere-se que essas

variações possam contribuir para escape da imunidade vacinal visto que mudanças nesses sítios podem dificultar a ligação dos anticorpos neutralizantes.

Como um todo, admite-se a ausência de evidências de que o processo de vacinação tenha atuado como um fator de pressão seletiva em relação às amostras G1P[8]. Contudo, a ocorrência de variantes genóticas reforça o potencial de *drifts* de RVA, o que pode contribuir para a contínua circulação de amostras com o mesmo genótipo da vacina. Por outro lado, a emergência de G12P[8] pode estar relacionada à ausência de imunidade vacinal específica para o genótipo G, mas também à versatilidade do genótipo, uma que esse tem sido identificado há bastante tempo em diferentes partes do mundo e inclusive em associação com diferentes genótipos P.

7 CONCLUSÕES

Os resultados do estudo permitiram as seguintes conclusões:

- Foi observado baixo percentual de positividade para RVA, a partir de amostras coletadas no período 2014-2015, podendo refletir o benefício da vacinação para RVA na Região;
- Amostras positivas para RVA foram detectadas preponderantemente em crianças com GEA, com e sem informação de vacinação para o vírus;
- Foi observada maior detecção viral em crianças maiores de 24 meses de idade o que parece sugerir mudança na faixa etária para a infecção;
- Não foi observada sazonalidade para RVA, o que difere de estudos prévios e sugere mudança no padrão de circulação viral;
- Todas as amostras genotipáveis foram caracterizadas como G12P[8], corroborando a emergência dessa associação no Brasil;
- As amostras do estudo, G1P[8] e G12P[8], foram caracterizadas como genogrupo I, o mesmo da amostra vacinal, sugerindo não ter havido pressão seletiva em função do processo de vacinação;
- As variações nucleotídicas refletiram-se na diferenciação em linhagens dos segmentos codantes de VP7 e VP6 para as amostras dos períodos pré e pós-vacina. Esse dado pode ser interpretado como uma variação genômica natural do vírus, considerando inclusive não ter havido diferença de linhagens para os segmentos codantes de VP4 e NSP4;
- Os segmentos de *dsRNA* das amostras G1P[8] de ambos os períodos mostraram alta identidade nucleotídica e de aminoácidos entre si e, em relação a amostra vacinal, enquanto para o segmento codante de VP7 da amostra G12P[8] foi observado menor identidade, dado esperado considerando ser a vacina G1;
- As alterações observadas em termos de nucleotídeos podem estar a refletir mutações sinônimas em nível de aminoácidos;
- A modelagem molecular mostrou que as maiores mudanças estruturais foram vistas para VP7 e VP4 da amostra G12P[8], sendo observadas modificações, principalmente nos sítios antígenos de 7-2 (VP7) e 8-1 (VP4), o que pode refletir em escape à imunidade vacinal.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora a diminuição da GEA e de hospitalização por RVA após a introdução do processo de vacinação no Brasil, o vírus ainda circula na população, seja com os mesmos genótipos das vacinas ou genótipos diferentes, o que sugere escape vacinal. Assim, estudos de monitoramento são essenciais para acompanhar a dinâmica do vírus na população.

Tais estudos devem incluir avaliações sobre os mecanismos evolutivos de RVA no contexto da vacinação, considerando o fato peculiar do genoma viral, *dsRNA* segmentado, o que favorece rearranjos e recombinações que podem refletir nas características antigênicas do vírus e, por conseguinte, em falha na imunidade conferida pela vacinação e possível emergência de novos vírus.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-MONEIM A. S.; AL-MALKY M. I.; ALSULAIMANI A. A.; ABUELSAAD A. S.; MOHAMED I.; ISMAIL A. K. Sequence diversity of VP4 and VP7 genes of human rotavirus strains in Saudi Arabia. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.12, n.12, 937-944, 2015.

ADAMS W. R.; KRAFT L. M. Epizootic diarrhea of infant mice: identification of the etiologic agent. **Science**, v.141, n.3578, p.359-60, 1963.

AFRIKANOVA I.; MIOZZO M. C.; GIAMBIAGIS.; BURRONE O. Phosphorylation generates different forms of rotavirus NSP5. **Journal of General Virology**, v.77, n.Pt 9, p.2059-2065, 1996.

AHMED K.; NAKAGOMI T.; NAKAGOMI O. Molecular identification of a novel G1 VP7 gene carried by a human rotavirus with a super-short RNA pattern. **Virus Genes**, v.35, n.2, p.141-145, 2007.

ALADIN F.; NAWAZ S.; ITURRIZA-GÓMARA M.; GRAY J. Identification of G8 rotavirus strains determined as G12 by rotavirus genotyping PCR: updating the current genotyping methods. **Journal of Clinical Virology**, v.47, n.4, p.340-344, 2010.

ALAM M. M.; KOBAYASHI N.; ISHINO M.; AHMED M. S.; AHMED M. U.; PAUL S. K.; MUZUMDAR B. K.; HUSSAIN Z.; WANG Y. H.; NAIK T. N. Genetic analysis of an ADRV-N-like novel rotavirus strain B219 detected in a sporadic case of adult diarrhea in Bangladesh. **Archives of Virology**, v.152, n.1, p.199-208, 2007.

ALFIERI A. A.; PARAZZI M. E.; TAKIUCHI E.; MÉDICI K. C.; ALFIERI A. F. Frequency of group A rotavirus in diarrhoeic calves in Brazilian cattle herds, 1998-2002. **Tropical Animal Health and Production**, v.38, n.7-8, p.521-526, 2006.

ALIABADIN.; TATE J. E.; HAYNES A. K.; PARASHAR U. D; CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Sustained decrease in laboratory detection of rotavirus after implementation of routine vaccination - United States, 2000-2014. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v.64, n.13, p.337-342, 2015.

ALKADAH A.; THIAM F.; MOUNIER M.; CHARPILLENNE A.; PONCET D.; KOHLI E.; BASSET C. Different profile and distribution of antigen specific T cells induced by intranasal and intrarectal immunization with rotavirus 2/6-VLP with and without LT-R192G. **Vaccine**, v.31, n.15, p.1924-1930, 2013.

ALMEIDA T. N.; FIACCADORI F. S.; SOUZA M.; BORGES A. M.; CARDOSO D. D. Molecular characterization of group A rotavirus before and after the introduction of vaccines in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.48, n.5, p.599-602, 2015.

ALTENBURG B. C.; GRAHAM D. Y.; ESTES M. K. Ultrastructural study of rotavirus replication in cultured cells. **Journal of General Virology**, v.46, n.1, p.75-85, 1980.

ALTSCHUL S. F.; GISH W.; MILLER W.; MYERS E. W.; LIPMAN D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v.215, n.3, p.403-410, 1990.

AMARAL M. S.; ESTEVAM G. K.; PENATTI M.; LAFONTAINE R.; LIMA I. C.; SPADA P. K.; GABBAY Y. B.; MATOS N. B. The prevalence of norovirus, astrovirus and adenovirus infections among hospitalised children with acute gastroenteritis in Porto Velho, state of Rondônia, western Brazilian Amazon. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.110, n.2, p.215-221, 2015.

AMARILLA A.; ESPÍNOLA E. E.; GALEANO M. E.; FARIÑA N.; RUSSOMANDO G.; PARRA G. I. Rotavirus infection in the Paraguayan population, from 2004 to 2005: high incidence of rotavirus strains with short electropherotype in children and adults. **Medical Science Monitor**, v.13, n.7, p.CR333-337, 2007.

AMOOD AL-KAMARANY M.; AL-AREQI L.; MUJALLY A.; ALKARSHY F.; NASSER A.; JUMAAN A. O. Diarrheal diseases hospitalization in Yemen before and after rotavirus vaccination. **Scientifica**, v.2016, p.1-6, 2016.

ANDREASI M. S. A.; BATISTA S. M. F.; TOZETTI I. A.; OZAKI C. O.; NOGUEIRA M. M.; FIACCADORI F. S.; BORGES A. M. T.; SANTOS R. A. T.; CARDOSO D. D. P. Rotavírus A em crianças de até três anos de idade, hospitalizadas com gastroenterite aguda em Campo Grande, Estado do Mato Grosso do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.40, n.4, p.411-414, 2007.

ANDREASI M. S.; CARDOSO D. D.; FERNANDES S. M.; TOZETTI I. A.; BORGES A. M.; FIACCADORI F. S.; SANTOS R. A.; SOUZA M. Adenovirus, calicivirus and astrovirus detection in fecal samples of hospitalized children with acute gastroenteritis from Campo Grande, MS, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.103, n.7, p.741-744, 2008.

ANGEL J.; TANG B.; FENG N.; GREENBERG H. B.; BASS D. Studies of the role for NSP4 in the pathogenesis of homologous murine rotavirus diarrhea. **The Journal of Infectious Diseases**, v.177, n.2, p.455-458, 1998.

ANSARI S. A.; SPRINGTHORPE V. S.; SATTAR S. A. Survival and vehicular spread of human rotaviruses: possible relation to seasonality of outbreaks. **Reviews of Infectious Diseases**, v.13, n.3, p.448-461, 1991.

ANTUNES H.; AFONSO A.; ITURRIZA M.; MARTINHO I.; RIBEIRO C.; ROCHA S.; MAGALHÃES C.; CARVALHO L.; BRANCA F.; GRAY J. G2P[4] the most prevalent rotavirus genotype in 2007 winter season in an European non-vaccinated population. **Journal of Clinical Virology**, v.45, n.1, p.76-78, 2009.

AOKI S. T.; SETTEMBRE E. C.; TRASK S. D.; GREENBERG H. B.; HARRISON S. C.; DORMITZER P. R. Structure of rotavirus outer-layer protein VP7 bound with a neutralizing Fab. **National Institutes of Health**, v.324, n.5933, p.1444-1447, 2009.

APONTE C.; PONCET D.; COHEN J. Recovery and characterization of a replicase complex in rotavirus-infected cells by using a monoclonal antibody against NSP2. **Journal of Virology**, v.70, n.2, p.985-991, 1996.

ARAÚJO I. T.; FERREIRA M. S.; FIALHO A. M.; ASSIS R. M.; CRUZ C. M.; ROCHA M.; LEITE J. P. Rotavirus genotypes P[4]G9, P[6]G9, and P[8]G9 in hospitalized children with acute gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, n.39, v.5, p.1999-2001, 2001.

ARIAS C. F.; ROMERO P.; ALVAREZ V.; LÓPEZ S. Trypsin activation pathway of rotavirus infectivity. **Journal of Virology**, v.70, n.9, p.5832-5839, 1996.

ARNOLDI F.; CAMPAGNA M.; EICHWALD C.; DESSELBERGER U.; BURRONE O. R. Interaction of rotavirus polymerase VP1 with nonstructural protein NSP5 is stronger than that with NSP2. **Journal of Virology**, v.81, n.5, p.2128-2137, 2007.

AZEVEDO M. P.; VLASOVA A. N.; SAIF L. J. Human rotavirus virus-like particle vaccines evaluated in a neonatal gnotobiotic pig model of human rotavirus disease. **Expert Review of Vaccines**, v.12, n.2, p.169-181, 2013.

BALL J. M.; TIAN P.; ZENG C. Q.; MORRIS A. P.; ESTES M. K. Age-dependent diarrhea induced by a rotaviral nonstructural glycoprotein. **Science**, v.272, n.5258, p.101-104, 1996.

BÁNYAI K.; LÁSZLÓ B.; DUQUE J.; STEELE A. D.; NELSON E. A.; GENTSCH J. R.; PARASHAR U. D. Systematic review of regional and temporal trends in global rotavirus strain diversity in the pre rotavirus vaccine era: insights for understanding the impact of rotavirus vaccination programs. **Vaccine**, v.30, Suppl 1, p.A122-130, 2012.

BARNES G. L.; LUND J. S.; ADAMS L.; MORA A.; MITCHELL S. V.; CAPLES A.; BISHOP R. F. Phase 1 trial of a candidate rotavirus vaccine (RV3) derived from a human neonate. **Journal of Paediatrics and Child Health**, v.33, n.4, p.300-304, 1997.

BARRO M.; PATTON J. T. Rotavirus nonstructural protein 1 subverts innate immune response by inducing degradation of IFN regulatory factor 3. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.102, n.11, p.4114-4119, 2005.

BARRO M.; PATTON J. T. Rotavirus NSP1 inhibits expression of type I interferon by antagonizing the function of interferon regulatory factors IRF3, IRF5, and IRF7. **Journal of Virology**, v.81, n.9, p.4473-4481, 2007.

BASTARDO J. W.; HOLMES I. H. Attachment of SA-11 rotavirus to erythrocyte receptors. **Infection and Immunity**, v.29, n.3, p.1134-1140, 1980.

BENEDITO RODRIGUES DA SILVA NETO; CECÍLIA MARIA ALVES DE OLIVEIRA; LUCÍLIA KATO; CARLA DOS SANTOS FREITAS; ROOSEVELT ALVES DA SILVA; GUILHERME OLIVEIRA QUINTINO; MARIA JOSÉ SOARES MENDES GIANNINI; JULHIANY DE FÁTIMA DA SILVA; CÉLIA MARIA DE ALMEIDA SOARES. Malate synthase from *Paracoccidioides spp*: Molecular docking, antifungal activity and the adhesion process. (Dados não publicados).

BERENDSEN H. J. C.; VAN DER SPOEL D.; VAN DRUNEN R. GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation. **Computer Physics Communications**, v.91, p.43-56, 1995.

BERGMANN C. C.; MAASS D.; PORUCHYNSKY M. S.; ATKINSON P. H.; BELLAMY A. R. Topology of the non-structural rotavirus receptor glycoprotein NS28 in the rough endoplasmatic reticulum. **The EMBO Journal**, v.8, n.6, p.1695-1703, 1989.

BERNSTEIN D. I. Live attenuated human rotavirus vaccine, Rotarix. **Seminars in Pediatric Infectious Diseases**, v.17, n.4, p.188-194, 2006.

BEROIS M.; SAPIN C.; ERKI.; PONCET D.; COHEN J. Rotavirus nonstructural protein NSP5 interacts with major core protein VP2. **Journal of Virology**, v.77, n.3, p.1757-1763, 2003.

BHANDARI N.; SHARMA P.; GLASS R. I.; RAY P.; GREENBERG H.; TANEJA S.; SAKSENA M.; RAO C. D.; GENTSCH J. R.; PARASHAR U.; MALDONADO Y.; WARD R. L.; BHAN M. K. Safety and immunogenicity of two live attenuated human rotavirus vaccine candidates, 116E and I321, in infants: Results of a randomized controlled trial. **Vaccine**, v.24, n.31-32, p.5817-5823, 2006.

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

BLACKHALL J.; FUENTES A.; HANSEN K.; MAGNUSSON G. Serine protein kinase activity associated with rotavirus phosphoprotein NSP5. **Journal of Virology**, v.71, n.1, p.138-44, 1997.

BLACKHALL J.; MUÑOZ M.; FUENTES A.; MAGNUSSON G. Analysis of rotavirus nonstructural protein NSP5 phosphorylation. **Journal of Virology**, v.72, n.8, p.6398-6405, 1998.

BORGES A. M. T.; DIAS M. B. L.; FIACCADORI F. S.; CARDOSO D. D. P. Monitoring the circulation of rotavirus among children after the introduction of the Rotarix vaccine in Goiânia, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.106, n.4, p.499-501, 2011.

BOUDREAUX C. E.; VILE D. C.; GILMORE B. L.; TANNER J. R.; KELLY D. F.; MCDONALD S. M. Rotavirus core shell subdomains involved in polymerase encapsidation into virus-like particles. **Journal of General Virology**, v.94, n.Pt8, p.1818-1826, 2013.

BOWMAN G. D.; NODELMAN I. M.; LEVY O.; LIN S. L.; TIAN P.; ZAMB T. J.; UDEM S. A.; VENKATARAGHAVAN B.; SCHUTT C. E. Crystal structure of the oligomerization domain of NSP4 from rotavirus reveals a core metal-binding site. **Journal of Molecular Biology**, v.304, n.5, p.861-871, 2000.

BRAECKMAN T.; VAN HERCK K.; RAES M.; VERGISON A.; SABBE M.; VAN DAMME P. Rotavirus vaccines in Belgium: policy and impact. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v.30, n.1, p.S21-24, 2011.

BRAECKMAN T.; VAN HERCK K.; MEYER N.; PIRÇON J. Y.; SORIANO-GABARRÓ M.; HEYLEN E.; ZELLER M.; AZOU M.; CAPIAU H.; DE KOSTER J.; MAERNOUDT A. S.; RAES M.; VERDONCK L.; VERGHOTE M.; VERGISON A.; MATTHIJNSSENS J.; VAN RANST M.; VAN DAMME P.; ROTABEL STUDY GROUP. Effectiveness of rotavirus vaccination in prevention of hospital admissions for rotavirus gastroenteritis among young children in Belgium: case-control study. **British Medical Journal**, v.345, p.e4752, 2012.

BROTTIER P.; NANDI P.; BREMONT M.; COHEN J. Bovine rotavirus segment 5 protein expressed in the baculovirus system interacts with zinc and RNA. **Journal of General Virology**, v.73, n.8, p.1931-1938, 1992.

CAMPAGNA M.; BUDINI M.; ARNOLDI F.; DESSELBERGER U.; ALLENDE J. E.; BURRONE O. R. Impaired hyperphosphorylation of rotavirus NSP5 in cells depleted of casein kinase 1alpha is associated with the formation of viroplasm with altered morphology and a moderate decrease in virus replication. **Journal of General Virology**, v.88, n.Pt 10, p.2800-2810, 2007.

CARDOSO D. D. P.; MARTINS R. M. B.; KITAJIMA E. W.; BARBOSA A. J.; CAMAROTA S. C. T.; AZEVEDO M. S. P. Rotavírus e adenovírus em crianças de 0-5 anos hospitalizadas com ou sem gastroenterite em Goiânia-Go, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.34, n.5, p.433-439, 1992.

CARDOSO D. D. P.; SOARES C. M. A.; AZEVEDO M. S. P.; LEITE J. P. G.; MUNFORD V.; RACZ M. L. Serotypes and subgroups of rotavirus in central Brazil. **Journal of Health Population and Nutrition**, v.18, n.2, p.39-43, 2000.

CARDOSO D. D. P.; RÁCZ M. L.; AZEVEDO M. S. P.; MARTINS R. M. B.; SOARES C. M. A. Genotyping of group a rotavirus samples from Brazilian children by probe hybridization. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.34, n.4, p.471-473, 2001.

CARDOSO D. D.; SOARES C. M.; DIAS E SOUZA M. B.; DE AZEVEDO M. DA S.; MARTINS R. M.; QUEIRÓZ D. A.; DE BRITO W. M.; MUNFORD V.; RÁCZ M. L. Epidemiological features of rotavirus infection in Goiânia, Goiás, Brazil, from 1986 to 2000. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.98, n.1, p.25-29, 2003.

CARMONA R. C. C. VP7 gene diversity of human rotavirus G1 strains detected in Sao Paulo, Brazil during 1996-2006. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade de São Paulo. 97f. 2010.

CARVALHO-COSTA F. A.; ASSIS R. M.; FIALHO A. M.; BÓIA M. N.; ALVES D. P. D.; MARTINS C. M. M. A.; LEITE J. P. G. Detection and molecular characterization of group A rotavirus from hospitalized children in Rio de Janeiro, Brazil, 2004. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.101, n.3, p.291-294, 2006.

CARVALHO-COSTA F. A.; ARAÚJO I. T.; SANTOS DE ASSIS R. M.; FIALHO A. M.; DE ASSIS MARTINS C. M.; BÓIA M. N.; LEITE J. P. Rotavirus genotype distribution after vaccine introduction, Rio de Janeiro, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v.15, n.1, p.95-97, 2009.

CASTELLO A. A.; NAKAGOMI T.; NAKAGOMI O.; JIANG B.; KANG J. O.; GLASS R. I.; GLIKMANN G.; GENTSCH J. R. Characterization of genotype P[9]G12 rotavirus strains from Argentina: high similarity with Japanese and Korean G12 strains. **Journal of Medical Virology**, v.81, n.2, p.371-381, 2009.

CDC – CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Intussusception among recipients of rotavirus vaccine United States, 1998-1999. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v.48, n.27, p.577-581, 1999.

CHACKO A. R.; ARIFULLAH M.; SASTRI N. P.; JEYAKANTHAN J.; UENO G.; SEKAR K.; READ R. J.; DODSON E. J.; RAO D. C.; SUGUNA K. Novel pentameric structure of the diarrhea-inducing region of the rotavirus enterotoxigenic protein NSP4. **Journal of Virology**, v.85, n.24, p.12721-12732, 2011.

CHAN W. K.; AU K. S.; ESTES M. K. Topography of the simian rotavirus nonstructural glycoprotein (NS28) in the endoplasmic reticulum membrane. **Virology**, v.164, n.2, p.435-442, 1988.

CHANDRAN A.; FITZWATER S.; ZHEN A.; SANTOSHAM M. Prevention of rotavirus gastroenteritis in infants and children: rotavirus vaccine safety, efficacy, and potential impact of vaccines. **Biologics**, v.4, p.213-229, 2010.

CHARPILLENNE A.; LEPAULT J.; REY F.; COHEN J. Identification of rotavirus VP6 residues located at the interface with VP2 that are essential for capsid assembly and transcriptase activity. **Journal of Virology**, v.76, n.15, p.7822-7831, 2002.

CHEN D.; LUONGO C. L.; NIBERT M. L.; PATTON J. T. Rotavirus open cores catalyze 5' capping and methylation of exogenous RNA: Evidence that VP3 is a methyltransferase. **Virology**, v.265, n.1, p.120-310, 1999.

CHEN J. Z.; SETTEMBRE E. C.; AOKI S. T.; ZHANG X.; BELLAMY A. R.; DORMITZER P. R.; HARRISON S. C.; GRIGORIEFF N. Molecular interactions in rotavirus assembly and uncoating seen by high-resolution cryo-EM. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.106, n.26, p.10644-10648, 2009.

CHEN V. B.; ARENDALL W. B.; HEADD J. J.; KEEDY D. A.; IMMORMINO R. M.; KAPRAL G. J. MolProbity: All-atom structure validation for macromolecular crystallography. **Acta Crystallographica Section D**, v.66, p.12-21, 2010.

CLARK H. F.; OFFIT P. A.; ELLIS R. W.; EIDEN J. J.; KRAH D.; SHAW A. R.; PICHICHERO M.; TREANOR J. J.; BORIAN F. E.; BELL L. M.; PLOTKIN S. A. The development of multivalent bovine rotavirus (strain WC3) reassortant vaccine for infants. **The Journal of Infectious Diseases**, v.174, n.S1, p.73-80, 1996.

COOK S. M.; GLASS R. I.; LEBARON C. W.; HO M. S. Global seasonality of rotavirus infections. **Bulletin of the World Health Organization**, v.68, n.2, p.171-177, 1990.

CORTHÉSY B.; BENUREAU Y.; PERRIER C.; FOURGEUX C.; PAREZ N.; GREENBERG H.; SCHWARTZ-CORNIL I. Rotavirus anti-VP6 secretory immunoglobulin A contributes to protection via intracellular neutralization but not via immune exclusion. **Journal of Virology**, v.80, n.21, p.10692-10699, 2006.

COSTA F. G.; DA SILVA NETO B. R.; GONÇALVES R. L.; DA SILVA R. A.; DE OLIVEIRA C. M. A.; KATO L. Alkaloids as inhibitors of malate synthase from *Paracoccidioides spp.*: Receptor-ligand interaction-based virtual screening and molecular docking studies, antifungal activity, and the adhesion process. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.59, p.5581-5594, 2015.

COSTA P. S. S.; CARDOSO D. D. P.; GRISI S. J. F. E.; SILVA P. A.; FIACCADORI F. S.; SOUZA M. B. L. D.; SANTOS R. A. T. Infecções e reinfecções por Rotavírus A: genotipagem e implicações vacinais. **Jornal de Pediatria**, v.80, n.2, p.119-122, 2004.

COSTANZO L. S. Fisiologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.321, 2007.

CURNS A. T.; PANOZZO C. A.; TATE J. E.; PAYNE D. C.; PATEL M. M.; CORTESE M. M.; PARASHAR U. D. Remarkable postvaccination spatiotemporal changes in United States rotavirus activity. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v.30, n.1, p.S54-55, 2011.

DARDEN T.; YORK D.; PEDERSEN L. Particle mesh Ewald: an $N \cdot \log(N)$ method for Ewald sums in large systems. **The Journal of Chemical Physics**, v.98, p.10089-10092, 1993.

DARRIBA D.; TABOADA G. L.; DOALLO R.; POSADA D. "jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing". **Nature Methods**, v.9, n.8, p.772, 2012.

DAS B. K.; GENSTSCH J. R.; CICIRELLO H. G.; WOODS P. A.; GUPTA A.; RAMACHANDRAN M.; KUMAR R.; BHAN M. K.; GLASS R. I. Characterization of rotavirus strains from newborns in New Delhi, India. **Journal of Clinical Microbiology**, v.32, n.7, p.1820-1822, 1994.

DA SILVA SOARES L.; DE FÁTIMA DOS SANTOS GUERRA S.; DO SOCORRO LIMA DE OLIVEIRA A.; DA SILVA DOS SANTOS F.; DE FÁTIMA COSTA DE MENEZES E. M.; MASCARENHAS J. D.; 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, n.6, p.1065-1072, 2014.

DAURA X.; GADEMANN K.; JAUN B.; SEEBACH D.; VAN GUNSTEREN W. F.; MARK AE. Peptide Folding: When Simulation Meets Experiment. **Angewandte Chemie International Edition**, v.38, p.236-240, 1999.

DECROLY E.; FERRON F.; LESCAR J.; CANARD B. Conventional and unconventional mechanisms for capping viral mRNA. **Nature Reviews Microbiology**, v.10, n.1, p.51-65, 2011.

DELOGU R.; IANIRO G.; CAMILLONIB.; FIORE L.; RUGGERI F. M. Unexpected spreading of G12P[8] rotavirus strains among young children in a small area of central Italy. **Journal of Medical Virology**, v.87, n.8, p.1292-1302, 2015.

DELOGU R.; IANIRO G.; MOREA A.; CHIRONNA M.; FIORE L.; RUGGERI F. M. Molecular characterization of two rare human G8P[14] rotavirus strains, detected in Italy in 2012. **Infection, Genetic and Evolution**, v.19, n.44, p.303-312, 2016.

DESAI R.; OLIVEIRA L. H.; PARASHAR U. D.; LOPMAN B.; TATE J. E.; PATEL M. M. Reduction in morbidity and mortality from childhood diarrhoeal disease after species A rotavirus vaccine introduction in Latin America - a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.106, n.8, p.907-911, 2011.

DESSELBERGER U. Global issues related to enteric viral infections. **Virus Disease**, v.25, n.2, p.147-149, 2014.

DEY A.; WANG H.; MENZIES R.; MACARTNEY K. Changes in hospitalizations for acute gastroenteritis in Australia after the national rotavirus vaccination program. **Medical Journal of Australia**, v.197, n.8, p.453-457, 2012.

DÍAZ-SALINAS M. A.; ROMERO P.; ESPINOSA R.; HOSHINO Y.; LÓPEZ S.; ARIAS C. F. The spike protein VP4 defines the endocytic pathway used by rotavirus to enter MA104 cells. **Journal of Virology**, n.87, v.3, p.1658-1663, 2013.

DO CARMO G. M.; YEN C.; CORTES J.; SIQUEIRA A. A.; DE OLIVEIRA W. K.; CORTEZ-ESCALANTE J. J.; LOPMAN B.; FLANNERY B.; DE OLIVEIRA L. H.; CARMO E. H.; PATEL M. Decline in diarrhea mortality and admissions after routine childhood rotavirus immunization in Brazil: a time-series analysis. **Public Library of Science Medicine**, v.8, n.4, p.e1001024, 2011.

DOMINGUES A. L.; MORAIS A. T.; CRUZ R. L.; MOREIRA L. P.; GOUVÊA V. S. Rotavirus-associated infantile diarrhea in Uberaba, Minas Gerais, on the wake of the Brazilian vaccination program. **Journal of Clinical Virology**, v.43, n.3, p.298-301, 2008.

DORMITZER P. R.; GREENBERG H. B.; HARRISON S. C. Purified recombinant rotavirus VP7 forms soluble, calcium-dependent trimers. **Virology**, v.277, n.2, p.420-428, 2000.

DORMITZER P. R.; SUN Z. Y.; BLIXT O.; PAULSON J. C.; WAGNER G.; HARRISON S. C. Specificity and affinity of sialic acid binding by the rhesus rotavirus VP8* core. **Journal of Virology**, v.76, n.20, p.10512-10517, 2002a.

DORMITZER P. R.; SUN Z. Y.; WAGNER G.; HARRISON S. C. The rhesus rotavirus VP4 sialic acid binding domain has a galectin fold with a novel carbohydrate binding site. **The EMBO Journal**, v.2, n.5, p.885-897, 2002b.

DÓRÓ R.; LÁSZLÓ B.; MARTELLA V.; LESHEM E.; GENTSCH J.; PARASHAR U.; BÁNYAI K. Review of global rotavirus strain prevalence data from six years post vaccine licensure surveillance: is there evidence of strain selection from vaccine pressure? **Infection, Genetics and Evolution**, v.28, p.446-461, 2014.

DÓRÓ R.; FARKAS S. L.; MARTELLA V.; BÁNYAI K. Zoonotic transmission of rotavirus: surveillance and control. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v.13, n.11, p.1337-1350, 2015.

DULGHEROFF A. C.; FIGUEIREDO E. F.; MOREIRA L. P.; MOREIRA K. C.; MOURA L. M.; GOUVÊA V. S.; DOMINGUES A. L. Distribution of rotavirus genotypes after vaccine introduction in the Triângulo Mineiro region of Brazil: 4-Year follow-up study. **Journal of Virology**, v.55, n.1, p.67-71, 2012.

DULGHEROFF A. C.; FIGUEIREDO E. F.; GOUVÊA V. S.; DOMINGUES A. L. Changes in epidemiology of rotavirus in the Triângulo Mineiro region of Brazil: lack of two consecutive rotavirus seasons. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.47, n.12, p.1091-1095, 2014.

EICHWALD C.; JACOB G.; MUSZYNSKI B.; ALLENDE J. E.; BURRONE O. R. Uncoupling substrate and activation functions of rotavirus NSP5: phosphorylation of Ser-67 by casein kinase 1 is essential for hyperphosphorylation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.101, n.46, p.16304-16309, 2004.

ELISEEVA I. A.; LYABIN D. N.; OVCHINNIKOV L. P. Poly(A)-binding proteins: structure, domain organization, and activity regulation. **Biochemistry**, v.78, n.13, p.1377-1391, 2013.

ERICSON B. L.; GRAHAM D. Y.; MASON B. B.; HANSEN H. H.; ESTES M. K. Two types of glycoprotein precursors are produced by the simian rotavirus SA11. **Virology**, v.127, n.2, p.320-332, 1983.

ESTES M. K.; GRAHAM D. Y.; MASON B. B. Proteolytic enhancement of rotavirus infectivity: molecular mechanisms. **Journal of Virology**, v.39, n.3, p.879-888, 1981.

ESTES M. K.; COHEN J. Rotavirus gene structure and function. **Microbiological Reviews**, v.53, n.4, p.410-449, 1989.

ESTES M. K.; KAPIKIAN A. Z. Rotaviruses. In: KNIPE D. M.; HOWLEY P. M. (Eds.), *Fields Virology*, 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, p.1917-74, 2007.

ESTES M. K.; GREENBERG H. B. Rotaviruses. In: KNIPE D. M.; HOWLEY P. M. (Eds.), *Fields Virology*, 6th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, p.1347-1401, 2013.

EWING B.; HILLIER L.; WENDL M. C.; GREEN P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, v.8, n.3, p.175-185, 1998.

EWING B.; GREEN P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Research**, v.8, n.3, p.186-194, 1998.

FINE P.; EAMES K.; HEYMANN D. L. "Herd Immunity": a rough guide. **Vaccines**, v.52, n.7, p.911-916, 2011.

FIORE L.; GREENBERG H. B.; MACKOW E. R. The VP8 fragment of VP4 is the rhesus rotavirus hemagglutinin. **Virology**, v.181, n.2, p.553-563, 1991.

FLANNERY B.; SAMAD S.; DE MORAES J. C.; TATE J. E.; DANOVARO-HOLLIDAY M. C.; DE OLIVEIRA L. H.; RAINEY J. J. Uptake of oral rotavirus vaccine and timeliness of routine immunization in Brazil's National Immunization Program. **Vaccine**, v.31, n.11, p.1523-1528, 2013.

FLEMING F. E.; BÖHM R.; DANG V. T.; HOLLOWAY G.; HASELHORST T.; MADGE P. D.; DEVERYSHETTY J.; YU X.; BLANCHARD H.; VON ITZSTEIN M.; COULSON B. S. Relative roles of GM1 ganglioside, N-acylneuraminic acids, and $\alpha 2\beta 1$ integrin in mediating rotavirus infection. **Journal of Virology**, n.88, v.8, p.4558-4571, 2014.

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

FREITAS E. R. I.; SOARES C. M. A.; FIACCADORI F. S.; SOUZA M.; PARENTE J. A.; COSTA P. S. S.; CARDOSO D. D. P. Occurrence of group A rotavirus mixed P genotypes infections in children living in Goiânia-Goiás, Brazil. **European Journal of Clinical Microbiology**, v.27, n.11, p.1065-1069, 2008.

FUJII Y.; SHIMOIKE T.; TAKAGI H.; MURAKAMI K.; TODAKA-TAKAIR.; PARK Y.; KATAYAMA K. Amplification of all 11 RNA segments of group A rotaviruses based on reverse transcription polymerase chain reaction. **Microbiology and Immunology**, v.56, n.9, p.630-638, 2012.

GAULT E., SCHNEPF N.; PONCET D.; SERVANT A.; TERAN S.; GARBARG-CHENON A. A human rotavirus with rearranged genes 7 and 11 encodes a modified NSP3 protein and suggests an additional mechanism for gene rearrangement. **Journal of Virology**, v.75, n.16, p.7305-7314, 2001.

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.

GENTSCH J. R.; WOODS P. A.; RAMACHANDRAN M.; DAS B. K.; LEITE J. P.; ALFIERI A.; KUMAR R.; BHAN M. K.; GLASS R. I. Review of G and P typing results from a global collection of rotavirus strains: implications for vaccine development. **The Journal of Infectious Diseases**, v.174, Suppl 1, p.S30-36, 1996.

GOLLOPR.; NAKAGOMI O.; SILBERSTEINI.; SHULMAN L. M.; GREENBERG H. B.; MENDELSON E.; SHIF I. Three forms of AU-1 like human rotaviruses differentiated by their overall genomic constellation and by the sequence of their VP8*. **Archives of Virology**, v.143, n.2, p.263-277, 1998.

GONZALEZ M. E.; CARRASCO L. Viroporins. **FEBS Letters**, v.552, n.1, p.28-34, 2003.

GORDON D.; ABAJIAN C.; GREEN P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**, v.8, n.3, p.195-202, 1998.

GORDON D.; DESMARAIS C.; GREEN P. Automated finishing with autofinish. **Genome Research**, v.11, n.4, p.614-625, 2001.

GORRELL R. J.; BISHOP R. F. Homotypic and heterotypic serum neutralizing antibody response to rotavirus proteins following natural primary infection and reinfection in children. **Journal of Medical Virology**, v.57, n.2, p.204-211, 1999.

GORZIGLIA M.; HOSHINO Y.; NISHIKAWA K.; MALOY W. L.; JONES R. W.; KAPIKIAN A. Z.; CHANOCK R. M. Comparative sequence analysis of the genomic segment 6 of four rotaviruses each with a different subgroup specificity. **Journal of General Virology**, v.69, n.Pt 7, p.1659-1669, 1988.

GHOSH S.; VARGHESE V.; SAMAJDAR S.; BHATTACHARYA S. K.; LOBAYASHI 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.177-188, 2006.

GOUVEA V.; GLASS R. I.; WOODS P.; TANIGUCHI K.; CLARK H. F.; FORRESTER B.; FANG Z. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v.28, n.2, p.276-282, 1990.

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

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

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

GOUVEA V. S.; DOMINGUES A. L.; NAVECA F. G.; PEDRO A. R.; BEVILACQUA C. C. Changing epidemiology of rotavirus-related hospitalizations in Rio de Janeiro, Brazil, from 2002 to 2006. **The Open Virology Journal**, v.1, p.47-50. 2007.

GRAHAM K. L.; FLEMING F. E.; HALASZ P.; HEWISH M. J.; NAGESHA H. S.; HOLMES I. H.; TAKADA Y.; COULSON B. S. Rotaviruses interact with alpha4beta7 and alpha4beta1 integrins by binding the same integrin domains as natural ligands. **Journal of General Virology**, v.86, Pt.12, p.3397-3408, 2005.

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

GUERRERO C. A.; SANTANA A. Y.; ACOSTA O. Mouse intestinal villi as a model system for studies of rotavirus infection. **Journal of Virological Methods**, v.168, n.1-2, p.22-30, 2010.

GUO C. T.; NAKAGOMI O.; MOCHIZUKI M.; ISHIDA H.; KISO M.; OHTA Y.; SUZUKI T.; MIYAMOTO D.; HIDARI K. I.; SUZUKI Y. Ganglioside GM(1a) on the cell surface is involved in the infection by human rotavirus KUN and MO strains. **The Journal of Biochemistry**, v.126, n.4, p.683-688, 1999.

GURGEL R. Q.; CUNLIFFE N. A.; NAKAGOMI O.; CUEVAS L. E. Rotavirus genotypes circulating in Brazil before national rotavirus vaccination: a review. **Journal of Clinical Virology**, v.43, n.1, p.1-8, 2008.

GURGEL R. G.; BOHLAND A. K.; VIEIRA S. C.; OLIVEIRA D. M.; FONTES P. B.; BARROS V. F.; RAMOS M. F.; DOVE W.; NAKAGOMI T.; NAKAGOMI O.; CORREIA J. B.; CUNLIFFE N.; CUEVAS L. E. Incidence of rotavirus and all-cause diarrhea in northeast Brazil following the introduction of a national vaccination program. **Gastroenterology**, v.137, n.6, p.1970-1975, 2009.

GUYTON A. C.; HALL J. E. Digestão e absorção no trato gastrointestinal. In: Tratado de Fisiologia Médica, Rio de Janeiro: Elsevier, p.808-818, 2006.

HALL T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In: Nucleic acids symposium series, p.95-98, 1999.

HASEGAWA M.; KISHINO H.; YANO T. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. **Journal of Molecular Evolution**, v.22, n.2, p.160-174, 1985.

HEMMING-HARLO M.; MARKKULA J.; HUHTI L.; SALMINEN M.; VESIKARI T. Decrease of rotavirus gastroenteritis to a low level without resurgence for 5 years after universal RotaTeq[®] vaccination in Finland. **The Pediatric Infectious Disease Journal**. 2016 (No prelo).

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

HOCHWALD C.; KIVELA L. Rotavirus vaccine, live, oral, tetravalent (RotaShield). **Pediatric Nursing**, v.25, n.2, p.203-204, 1999.

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**, v.96, n.12, p.3519-24, 2015.

HOLMES I. H. Development of rotavirus molecular epidemiology: electropherotyping. **Archives of Virology**, v.12, p.87-91, 1996.

HU L.; CRAWFORD S. E.; CZAKO R.; CORTES-PENFIELD N. W.; SMITH D. F.; LE PENDU J.; ESTES M. K.; PRASAD B. V. Cell attachment protein VP8* of a human rotavirus specifically interacts with A-type histo-blood group antigen. **Nature**, v.485, n.7397, p.256-259, 2012.

HUA J.; MANSELL E. A.; PATTON J. T. Comparative analysis of the rotavirus NS53 gene: conservation of basic and cysteine-rich regions in the protein and possible stem-loop structures in the RNA. **Virology**, v.196, n.1, p.372-378, 1993.

HUA J.; CHEN X.; PATTON J. T. Deletion mapping of the rotavirus metalloprotein NS53 (NSP1): the conserved cysteine-rich region is essential for virus-specific RNA binding. **Journal of Virology**, v.68, n.6, p.3990-4000, 1994.

HULST M.; KERSTENS H.; DE WIT A.; SMITS M.; VAN DER MEULEN J.; NIEWOLD T. Early transcriptional response in the jejunum of germ-free piglets after oral infection with virulent rotavirus. **Archives of Virology**, v.153, n.7, p.1311-1322, 2008.

HYSER J. M.; COLLINSON-PAUTZ M. R.; UTAMA B.; ESTES M. K. Rotavirus disrupts calcium homeostasis by NSP4 viroporin activity. **MBio**, v.1, n.5, p.e00265-10, 2010.

IANIRO G.; DELOGU R.; FIORE L.; RUGGERI F. M.; ROTANET-ITALY STUDY GROUP. Genetic variability of VP7, VP4, VP6 and NSP4 genes of common human G1P[8] rotavirus strains circulating in Italy between 2010 and 2014. **Virus Research**, v.220, p.117-128, 2016.

ICTV – INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES 2015.
Disponível em: < <http://www.ictvonline.org/index.asp> >. Acesso em: 02/03/2016.

IDE T.; KOMOTO S.; HIGO-MORIGUCHI K.; HTUN K. W.; MYINT Y. Y.; MYAT T. W.; THANT K. Z.; THU H. M.; WIN M. M.; OO H. N.; HTUT T.; WAKUDA M.; DENNIS F. E.; HAGA K.; FUJII Y.; KATAYAMA K.; RAHMAN S.; NGUYEN S. V.; UMEDA K.; OGUMA K.; TSUJI T.; TANIGUCHI K. Whole genomic analysis of human G12P[6] and G12P[8] rotavirus strains that have emerged in Myanmar. **PLoS One**, v.10, n.5, p.e0124965, 2015.

IMBERT-MARCILLE B. M.; BARBÉ L.; DUPÉ M.; LE MOULLAC-VAIDYE B.; BESSE B.; PELTIER C.; RUVOËN-CLOUET N.; LE PENDU J. A FUT2 gene common polymorphism determines resistance to rotavirus A of the P[8] genotype. **The Journal of Infectious Diseases**, v.209, n.8, p.1227-1230, 2014.

ISA P.; ARIAS C. F.; LÓPEZ S. Role of sialic acids in rotavirus infection. **Glycoconjugate Journal**, v.23, n.1-2, p.27-37, 2006.

ISMAILI-JAHA V.; SHALA M.; AZEMI M.; HOXHA-KAMBERI T.; AVDIU M.; SPAHIU S.; JAHA L. Characteristics of rotavirus diarrhea in hospitalized children in Kosovo. **Mater Sociomed**, v.26, n.5, p.335-338, 2014.

ITURRIZA-GÓMARA M.; ISHERWOOD B.; DESSELBERGER U.; GRAY J. Reassortment in vivo: driving force for diversity of human rotavirus strains isolated in the United Kingdom between 1995 and 1999. **Journal of Virology**, v.75, n.8, p.3696-3705, 2001.

ITURRIZA-GÓMARA M.; AUCHTERLONIE I. A.; ZAW W.; MOLYNEAUX P.; DESSELBERGER U.; GRAY J. Rotavirus gastroenteritis and central nervous system (CNS) infection: characterization of the VP7 and VP4 genes of rotavirus strains isolated from paired fecal and cerebrospinal fluid samples from a child with CNS disease. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, n.12, p.4797-4799, 2002.

ITURRIZA-GÓMARA M., ANDERTON E, KANG G, GALLIMORE C, PHILLIPS W, DESSELBERGER U, GRAY J. Evidence for genetic linkage between the gene segments encoding NSP4 and VP6 proteins in common and reassortant human rotavirus strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.8, p.3566-3573, 2003.

JALILVAND S.; MARASHI S. M.; SHOJA Z. Rotavirus VP6 preparations as a non-replicating vaccine candidates. **Vaccine**, v.33, n.29, p.3281-3287, 2015.

JAYARAM H.; TARAPOREWALA Z.; PATTON J. T.; PRASAD B. V. Rotavirus protein involved in genome replication and packaging exhibits a HIT-like fold. **Nature**, v.417, n.6886, p.311-315, 2002.

JAYARAM H.; ESTES M. K.; PRASAD B. V. Emerging themes in rotavirus cell entry, genome organization, transcription and replication. **Virus Research**, v.101, n.1, p.67-81, 2004.

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.

JOHANSEN K.; SVENSSON L. Neutralization of rotavirus and recognition of immunologically important epitopes on VP4 and VP7 by human IgA. **Archives of Virology**, v.142, n.7, p.1491-1498, 1997.

JUNQUEIRA L. C.; CARNEIRO J. O trato digestivo. In: Histologia básica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.305-306, 2008.

JUSTINO M. C.; LINHARES A. C.; LANZIERI T. M.; MIRANDA Y.; MASCARENHAS J. D.; ABREU E.; GUERRA S. F.; OLIVEIRA A. S.; DA SILVA V. B.; SANCHEZ N.; MEYER N.; SHAFI F.; ORTEGA-BARRIA E.; SORIANO-GABARRÓ M.; COLINDRES R. E. Effectiveness of the monovalent G1P[8] human rotavirus vaccine against hospitalization for severe G2P[4] rotavirus gastroenteritis in Belém, Brazil. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v.30, n.5, p.396-401, 2011.

KALICA A. R.; FLORES J.; GREENBERG H. B. Identification of the rotaviral gene that codes for hemagglutination and protease-enhanced plaque formation. **Virology**, v.125, n.1, p.194-205, 1983.

KALJOT K. T.; SHAW R. D.; RUBIN D. H.; GREENBERG H. B. Infectious rotavirus enters cells by direct cell membrane penetration, not by endocytosis. **Journal of Virology**, v.62, n.4, p.1136-1144, 1988.

KARAFILLAKIS E.; HASSOUNAH S.; ATCHISON C. Effectiveness and impact of rotavirus vaccines in Europe, 2006-2014. **Vaccine**, v.33, n.18, p.2097-2107, 2015.

KIM H. J.; PARK J. G.; MATTHIJNSSENS J.; LEE J. H.; BAE Y. C.; ALFAJARO M. M.; PARK S. I.; KANG M. I.; CHO K. O. 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.

KIRKWOOD C. D.; ROCZO-FARKAS S.; AUSTRALIAN ROTAVIRUS SURVEILLANCE GROUP. Australian Rotavirus Surveillance Program annual report, 2014. **Communicable Diseases Intelligence**, v.39, n.3, p.E337-346, 2015.

KIRTON A.; BUSCHE K.; ROSS C.; WIRRELL E. Acute necrotizing encephalopathy in caucasian children: two cases and review of the literature. **Journal of Child Neurology**, v.20, n.6, p.527-532, 2005.

KOBAYASHI N.; LINTAG I. C.; URASAWA T.; TANIGUCHI K.; SANIEL M. C.; URASAWA S. Unusual human rotavirus strains having subgroup I specificity and "long" RNA electrophoretotype. **Archives of Virology**, v.109, n.1-2, p.11-23, 1989.

KUMAR M.; JAYARAM H.; VASQUEZ-DEL CARPIO R.; JIANG X.; TARAPOREWALA Z. F.; JACOBSON R. H.; PATTON J. T.; PRASAD B. V. Crystallographic and biochemical analysis of rotavirus NSP2 with nucleotides reveals a nucleoside diphosphate kinase-like activity. **Journal of Virology**, v.81, n.22, p.12272-12284, 2007.

KUMAR S.; STECHER G.; TAMURA K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular Biology and Evolution**, v.33, n.7, p.1870-1874, 2016.

LA ROSA G.; DELLA LIBERA S.; PETRICCA S.; IACONELLI M.; DONIA D.; SACCUCCI P.; CENKO F.; XHELILAJ G.; DIVIZIA M. Genetic diversity of human adenovirus in children with acute gastroenteritis, Albania, 2013-2015. **BioMed Research International**, v.2015, n.142912, p.1-7, 2015.

LAWTON J. A.; ESTES M. K.; PRASAD B. V. Three-dimensional visualization of mRNA release from actively transcribing rotavirus particles. **Nature Structural & Molecular Biology**, v.4, n.2, p.118-121, 1997.

LEITE J. P. G.; ALFIERI A. A.; WOODS P.; GLASS R. I.; GENTSCH J. R. Rotavirus G and P types in Brazil: characterization by RT-PCR, probe hybridization, and sequence analysis. **Archives of Virology**, v.141, n.12, p.2365-2374, 1996.

LIMA C. D.; KLEIN M. G.; HENDRICKSON W. A. Structure-based analysis of catalysis and substrate definition in the HIT protein family. **Science**, v.278, n.5336, p.286-290, 1997.

LINDORFF-LARSEN K.; PIANA S.; PALMO K.; MARAGAKIS P.; KLEPEIS J. L.; DROR R. O. Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v.78, p.1950-1958 2010.

LINHARES A. C.; PINHEIRO F. P.; SCHMETZ C.; MÜLLER G.; PETERS D. Rotavírus em Belém do Pará, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.19, p.278, 1977.

LINHARES A. C.; BREESE J. S. Rotavirus vaccines and vaccination in Latin America. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v.8, n.5, p.305-331, 2000.

LINHARES A. C.; JUSTINO M. C. Rotavirus vaccination in Brazil: effectiveness and health impact seven years post-introduction. **Expert Review of Vaccines**, v.13, n.1, p.43-57, 2014.

LIU M.; MATTION N. M.; ESTES M. K. Rotavirus VP3 expressed in insect cells possesses guanylyltransferase activity. **Virology**, v.188, n.1, p.77-84, 1992.

LÓPEZ S.; ARIAS C. F.; BELL J. R.; STRAUSS J. H.; ESPEJO R. T. Primary structure of the cleavage site associated with trypsin enhancement of rotavirus SA11 infectivity. **Virology**, v.144, n.1, p.11-19, 1985.

LÓPEZ T.; CAMACHO M.; ZAYAS M.; NÁJERA R.; SÁNCHEZ R.; ARIAS C. F.; LÓPEZ S. Silencing the morphogenesis of rotavirus. **Journal of Virology**, v.79, n.1, p.184-192, 2005.

LOURENÇO M. H.; NICOLAS J. C.; COHEN J.; SCHERRER R.; BRICOUT F. Study of human rotavirus genome by electrophoresis: attempt of classification among strains isolated in France. **Annales de l'Institut Pasteur/Virologie**, v.132, n.2, p.161-173, 1981.

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

LUCHS A.; CILLI A.; MORILLO S. G.; CARMONA R. C. C.; TIMENETSKY M. C. S. Rotavirus genotypes circulating in Brazil, 2007-2012: Implications for the vaccine program. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.57, n.4, p.305-313, 2015.

LUCHS A.; CILLI A.; MORILLO S. G.; DE SOUZA GREGÓRIO D.; FARIAS DE SOUZA K. A.; VIEIRA H. R.; DE MIRA FERNANDES A.; DE CÁSSIA COMPAGNOLI CARMONA R.; TIMENETSKY M. DO C. Detection of the emerging rotavirus G12P[8] genotype at high frequency in Brazil in 2014: Successive replacement of predominant strains after vaccine introduction. **Acta Tropica**, v.156, p.87-94, 2016.

MACKSOUD J. G. Invaginação intestinal. In: *Cirurgia Pediátrica*. Rio de Janeiro: Revinter, p.752-761, 1998.

MAES P.; MATTHIJNSSENS J.; RAHMAN M.; VAN RANST M. RotaC: a web-based tool for the complete genome classification of group A rotaviruses. **BioMed Central Microbiology**, v.9, n.238, p.1-4, 2009.

MAHONEY M. W.; JORGENSEN W. L. A five-site model for liquid water and the reproduction of the density anomaly by rigid, nonpolarizable potential functions. **The Journal of Chemical Physics**, v.112, p.8910, 2000.

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

MANEEKARN N.; KHAMRIN P.; USHIJIMA H. Rotavirus. In: DONGYOU LIU. *Molecular Detection of Human Viral Pathogens*, p.791-799, 2010.

MANSELL E. A.; PATTON J. T. Rotavirus RNA replication: VP2, but not VP6, is necessary for viral replicase activity. **Journal of Virology**, v.64, n.10, p.4988-4996, 1990.

MARTELLA V.; BÁNYAI K.; MATTHIJNSSENS J.; BUONAVOGLIA C.; CIARLET M. Zoonotic aspects of rotaviruses. **Veterinary Microbiology**, v.140, n.3-4, p.246-255, 2010.

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.

MAST T. C.; WANG F. T.; SU S.; SEEGER J. D. Evidence of herd immunity and sustained impact of rotavirus vaccination on the reduction of rotavirus-related medical encounters among infants from 2006 through 2011 in the United States. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v.34, n.6, p.615-620, 2015.

MATHIEU M.; PETITPAS I.; NAVAZA J.; LEPAULT J.; KOHLI E.; POTHIER P.; PRASAD B. V.; COHEN J.; REY F. A. Atomic structure of the major capsid protein of rotavirus: implications for the architecture of the virion. **European Molecular Biology Organization**, v.20, n.7, p.1485-1497, 2001.

MATSON D. O.; ESTES M. K.; BURNS J. W.; GREENBERG H. B.; TANIGUCHI K.; URASAWA S. Serotype variation of human group A rotaviruses in two regions of the USA. **The Journal of Infectious Diseases**, v.162, n.3, p.605-614, 1990.

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

MATTHIJNSSENS J.; CIARLET M.; RAHMAN M.; ATTOUI H.; BÁNYAI K.; ESTES M. K.; GENTSCH J. R.; ITURRIZA-GÓMARA M.; KIRKWOOD C. D.; MARTELLA V.; MERTENS P. P.; NAKAGOMI O.; PATTON J. T.; RUGGERI F. M.; SAIF L. J.; SANTOS N.; STEYER A.; TANIGUCHI K.; DESSELBERGER U.; VAN RANST M. Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. **Archives of Virology**, v.153, n.8, p.1621-1629, 2008.

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.; 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, 2010.

MATTHIJNSSENS J.; CIARLET M.; MCDONALD S. M.; ATTOUI H.; BÁNYAI K.; BRISTER J. R.; BUESA J.; ESONA M. D.; ESTES M. K.; GENSTSCH J. R.; ITURRIZA-GÓMARA M.; JOHNE R.; KIRKWOOD C. D.; MARTELLA V.; MERTENS P. P.; NAKAGOMI O.; PARRENO 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.

MATTION N. M.; MITCHELL D. B.; BOTH G. W.; ESTES M. K. Expression of rotavirus proteins encoded by alternative open reading frames of genome segment 11. **Virology**, v.181, n.1, p.295-304, 1991.

MCCLAIN B.; SETTEMBRE E.; TEMPLE B. R.; 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.; PATTON J. T. Molecular characterization of a subgroup specificity associated with the rotavirus inner capsid protein VP2. **Journal of Virology**, v.82, n.6, p.2752-2764, 2008.

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.e1000634, 2009.

MCDONALD S. M.; MCKELL A. O.; RIPPINGER C. M.; MCALLEN J. K.; AKOPOV A.; KIRKNESS E. F.; PAYNE D. C.; EDWARDS K. M.; CHAPPELL J. D.; PATTON J. T. Diversity and relationships of cocirculating modern human rotaviruses revealed using large-scale comparative genomics. **Journal of Virology**, v.86, n.17, p.9148-9162, 2012.

MCDONALD S. M.; NELSON M.; TURNER P. E.; PATTON J. T. Reassortment in segmented RNA viruses: mechanisms and outcomes. **Nature**, v.14, p.448-460, 2016.

MEBUS C. A.; UNDERDAHL N. R.; RHODES M. B.; TWIEHAUS M. J. Calf diarrhea (scours): reproduced with a virus from a field outbreak. **University of Nebraska Res Bull**, v.233, p.1-16, 1969.

MELO G. Z. S.; COSTA C. A.; SANTOS I. G. C. Diversidade molecular de rotavírus do grupo A na cidade de Manaus, Estado do Amazonas, Brasil, 2004 a 2006. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v.22, n.2, p.265-272, 2013.

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

MIJATOVIC-RUSTEMPASIC S.; BÁNYAI K.; ESONA M. D.; FOYTICH K.; BOWEN M. D.; GENTSCH J. R. Genome sequence based molecular epidemiology of unusual US Rotavirus A G9 strains isolated from Omaha, USA between 1997 and 2000. **Infectiton, Genetic and Evolution**, v.11, n.2, p.522-527, 2011.

MOE K.; SHIRLEY J. A. The effects of relative humidity and temperature on the survival of human rotavirus in faeces. **Archives of Virology**, v.72, n.3, p.179-186, 1982.

MOHAN K. V.; MULLER J.; SOM I.; ATREYA C. D. The N- and C-terminal regions of rotavirus NSP5 are the critical determinants for the formation of viroplasm-like structures independent of NSP2. **Journal of Virology**, v.77, n.22, p.12184-12192, 2003.

MONTERO H.; ARIAS C. F.; LOPEZ S. Rotavirus nonstructural protein NSP3 is not required for viral protein synthesis. **Journal of Virology**, v.80, n.18, p.9031-9038, 2006.

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

MOROZOVA O. V.; SASHINA T. A.; FOMINA S. G.; NOVIKOVAN. A. Comparative characteristics of the VP7 and VP4 antigenic epitopes of the rotaviruses circulating in Russia (Nizhny Novgorod) and the Rotarix and RotaTeq vaccines. **Archives of Virology**, v.160, n.7, p.1693-1703, 2015.

MORRIS A. P.; SCOTT J. K.; BALL J. M.; ZENG C. Q.; O'NEAL W. K.; ESTES M. K. NSP4 elicits age-dependent diarrhea and Ca(2+)-mediated I(-) influx into intestinal crypts of CF mice. **American Journal of Physiology**, v.277, n.2 Pt 1, p.431-444, 1999.

MS – MINISTÉRIO DA SAÚDE. Informe Técnico. Doença Diarreica por Rotavírus: Vigilância Epidemiológica e Prevenção pela Vacina Oral de Rotavírus. Brasília-Brasil. Março, 2006.

MS – MINISTÉRIO DA SAÚDE. Cadernos de Atenção Básica. Acolhimento a demanda espontânea. Queixas mais comuns na atenção básica. Volume II, n. 28, p. 56. Brasília-Brasil, 2012.

MS – MINISTÉRIO DA SAÚDE. <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/defthtm.exe?pni/cnv/cpniuf.def> Acesso em: 14/03/2016.

MUKHERJEE A.; CHATTOPADHYAY S.; BAGCHI P.; DUTTA D.; SINGH B. N.; ARORA R.; PARASHAR U. D.; GENTSCH J. R.; CHAWLA-SARKAR M. Surveillance and molecular characterization of rotavirus strains circulating in Manipur, North-Eastern India: Increasing prevalence of emerging G12 strains. **Infection, Genetics and Evolution**, v.10, n.2, p.311-320, 2010.

MUNFORD V.; SOUZA E. C.; CARUZO T. A. R.; MARTINEZ M. B.; RÁCZ M. L. Serological and molecular diversity of human rotavirus in São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal Microbiology**, v.38, n.3, p.459-466, 2007.

MUNFORD V.; GILIO A. E.; DE SOUZA E. C.; CARDOSO D. M.; CARDOSO D. D.; BORGES A. M.; COSTA P. S.; MELGAÇO I. A.; ROSA H.; CARVALHO P. R.; GOLDANI M. Z.; MOREIRA E. D. JR.; SANTANA C.; EL KHOURY A.; IKEDO F.; RÁCZ M. L. Rotavirus Gastroenteritis in Children in 4 Regions in Brazil: A Hospital-Based Surveillance Study. **The Journal of Infectious Diseases**, v.S1, p.S107-S113, 2009.

MURPHY T. V.; GARGIULLO P. M.; MASSOUDI M. S.; NELSON D. B.; JUMAAN A. O.; OKORO C. A.; ZANARDI L. R.; SETIA S.; FAIR E.; LEBARON C. W.; WHARTON M.; LIVENGOOD J. R.; ROTAVIRUS INTUSSUSCEPTION INVESTIGATION TEAM. Intussusception among infants given an oral rotavirus vaccine. **The New England Journal of Medicine**, v.344, n.8, p.564-572, 2001.

NAKAGOMI O.; OYAMADA H.; KUROKI S.; KOBAYASHI Y.; OHSHIMA A.; NAKAGOMI T. Molecular identification of a novel human rotavirus in relation to subgroup and electropherotype of genomic RNA. **Journal of Medical Virology**, v.28, n.3, p.163-168, 1989.

NAKAGOMI T.; HORIE Y.; KOSHIMURA Y.; GREENBERG H. B.; NAKAGOMI O. Isolation of a human rotavirus strain with a super-short RNA pattern and a new P2 subtype. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, n.4, p.1213-16, 1999.

NEVES M. A.; PINHEIRO H. H.; SILVA R. S.; LINHARES A. C.; SILVA L. D.; GABBAY Y. B.; SILVA M. C.; LOUREIRO E. C.; SOARES L. S.; MASCARENHAS J. D. High prevalence of G12P[8] rotavirus strains in Rio Branco, Acre, Western Amazon, in the post-rotavirus vaccine introduction period. **Journal of Medical Virology**, v.88, n.5, p.782-789, 2016.

O'BRIEN J. A.; TAYLOR J. A.; BELLAMY A. R. Probing the structure of rotavirus NSP4: a short sequence at the extreme C terminus mediates binding to the inner capsid particle. **Journal of Virology**, v.74, n.11, p.5388-5394, 2000.

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.

OLIVEIRA C. S.; LINHARES A. C. Rotavirus: clinical features and prevention. **Jornal de Pediatria**, v.75, n.S1, p.S91-S102, 1999.

OLIVEIRA D. M. M.; SOUZA M.; FIACCADORI F. S.; SANTOS H. C. P.; CARDOSO D. D. P. Monitoring of calicivirus among day-care children: evidence of asymptomatic viral excretion and first report of GI.7 Norovirus and GI.3 Sapovirus in Brazil. **Journal of Medical Virology**, v.86, n.9, p.1569-1575, 2014.

O'RYAN M.; LUCERO Y.; LINHARES A. C. Rotarix®: vaccine performance 6 years postlicensure. **Expert Review of Vaccines**, v.10, n.12, p.1645-1659, 2011.

O'RYAN G. M.; ASHKENAZI-HOFFNUNG L.; O'RYAN-SORIANO M. A.; ASHKENAZI S. Management of acute infectious diarrhea for children living in resource-limited settings. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v.12, n.5, p.621-632, 2014.

PADILLA-NORIEGA L.; PANIAGUA O.; GUZMÁN-LEÓN S. Rotavirus protein NSP3 shuts off host cell protein synthesis. **Virology**, v.298, n.1, p.1-7, 2002.

PÁLL S.; ABRAHAM M. J.; KUTZNER C.; HESS B.; LINDAHL E. Tackling exascale software challenges in molecular dynamics simulations with GROMACS. **Lecture Notes in Computer Science**, p. 3-27, 2015.

PASTOR A. R.; RODRÍGUEZ-LIMAS W. A.; CONTRERAS M. A.; ESQUIVEL E.; ESQUIVEL-GUADARRAMA F.; RAMÍREZ O. T.; PALOMARES L. A. The assembly conformation of rotavirus VP6 determines its protective efficacy against rotavirus challenge in mice. **Vaccine**, v.32, n.24, p.2874-2877, 2014.

PATERNINA-CAICEDO A.; PARASHAR U. D.; ALVIS-GUZMÁN N.; DE OLIVEIRA L. H.; CASTAÑO-ZULUAGA A.; COTES-CANTILLO K.; GAMBOA-GARAY O.; CORONELL-RODRÍGUEZ W.; DE LA HOZ-RESTREPO F. Effect of rotavirus vaccine on childhood diarrhea mortality in five Latin American countries. **Vaccine**, v.33, n.32, p.3923-3928. 2015.

PATH – PROGRAM FOR APPROPRIATE TECHNOLOGY IN HEALTH. Disponível em:< <http://sites.path.org/rotavirusvaccine/country-introduction-maps-and-spreadsheet/>>. Acesso em: 08/04/2016.

PATTON J. T.; JONES M. T.; KALBACH A. N.; HE Y-W.; XIAOBO J. Rotavirus RNA polymerase requires the core shell protein to synthesize the double-stranded RNA genome. **Journal of Virology**, v.71, n.12, p.9618-9626, 1997.

PATTON J. T.; CHEN D. RNA-binding and capping activities of proteins in rotavirus open cores. **Journal of Virology**, v.73, n.2, p.1382-1391, 1999.

PATTON J. T.; CHNAIDERMAN J.; SPENCER E. Open reading frame in rotavirus mRNA specifically promotes synthesis of double-stranded RNA: template size also affects replication efficiency. **Virology**, v.264, n.1, p.167-180, 1999.

PATTON J. T. Rotavirus diversity and evolution in the post-vaccine world. **Discovery Medicine**, v.13; n.68, p.85-97, 2012.

PEREIRA H. G.; AZEREDO R. S.; LEITE J. P. G.; CANDEIAS J. A. N.; RÁCZ M. L.; LINHARES A. C.; GABBAY Y. B.; TRABULSI J. R. Electrophoretic study of the genome of human rotaviruses from Rio de Janeiro, São Paulo and Pará, Brazil. **Journal of Hygiene on Cambridge**, v.90, n.1, p.117-125, 1983.

PÉREZ J. F.; CHEMELLO M. E.; LIPRANDI F.; RUIZ M. C.; MICHELANGELI F. Oncosis in MA104 cells is induced by rotavirus infection through an increase in intracellular Ca²⁺ concentration. **Virology**, v.252, n.1, p.17-27, 1998.

PÉREZ-SCHAEL I.; GUNTIÑAS M. J.; PÉREZ M.; PAGONE V.; ROJAS A. M.; GONZÁLEZ R.; CUNTO W.; HOSHINO Y.; KAPIKIAN A. Z. Efficacy of the rhesus rotavirus-based quadrivalent vaccine in infants and young children in Venezuela. **The New England Journal of Medicine**, v.337, n.17, p.1181-1187, 1997.

PESAVENTO J. B.; CRAWFORD S. E.; ESTES M. K.; PRASAD B. V. Rotavirus proteins: structure and assembly. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v.309, p.189-219, 2006.

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.

PIZARRO J. L.; SANDINO A. M.; PIZARRO J. M.; FERNÁNDEZ J.; SPENCER E. Characterization of rotavirus guanylyltransferase activity associated with polypeptide VP3. **Journal of General Virology**, v.72, n.2, p.325-332, 1991.

POLLARDE E. L.; MALPICA-LLANOS T.; FRIBERG I. K.; FISCHER-WALKER C.; ASHRAF S.; WALKER N. Estimating the herd immunity effect of rotavirus vaccine. **Vaccine**, v.33, n.32, p.3795-3800, 2015.

PONCET D.; LINDENBAUM P.; L'HARIDON R.; COHEN J. In vivo and in vitro phosphorylation of rotavirus NSP5 correlates with its localization in viroplasm. **Journal of Virology**, v.71, n.1, p.34-41, 1997.

PONGSUWANNA Y.; GUNTAPONG R.; CHIWAKUL M.; TACHAROENMUANG R.; ONVIMALA N.; WAKUDA M.; KOBAYASHI N.; TANIGUCHI K. Detection of a human rotavirus with G12 and P[9] specificity in Thailand. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, n.4, p.1390-1394, 2002.

PRADO R. S. DO; ALVES R. J.; OLIVEIRA C. M. A. DE; KATO L.; SILVA R. A. DA, QUINTINO G. O. Inhibition of *Paracoccidioides lutzii* Pb01 isocitrate lyase by the natural compound argentilactone and its semi-synthetic derivatives. **PLoS One**, v.9, p. e94832, 2014.

PRASAD B. V.; BURNS J. W.; MARIETTA E.; ESTES M. K.; CHIU W. Localization of VP4 neutralization sites in rotavirus by three-dimensional cryo-electron microscopy. **Nature**, v.343, n.6257, p.476-479, 1990.

RAHMAN M.; SULTANA R.; AHMED G.; NAHAR S.; HASSAN Z. M.; SAIADA F.; PODDER G.; FARUQUE A. S.; SIDDIQUE A. K.; SACK D. A.; MATTHIJNSSENS J.; VAN RANST M.; AZIM T. Prevalence of G2P[4] and G12P[6] rotavirus, Bangladesh. **Emerging Infectious Diseases**, v.13, n.1, p.18-24, 2007.

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.

RAMANI S.; KANG G. Viruses causing childhood diarrhoea in the developing world. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v.22, n.5, p.477-482, 2009.

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

RCWG – ROTAVIRUS CLASSIFICATION WORKING GROUP. Disponível em: <<https://rega.kuleuven.be/cev/viralmetagenomics/virus-classification/rcwg>>. Acesso em: 08/04/2016.

RENNELS M. B.; GLASS R. I.; DENNEHY P. H.; BERNSTEIN D. I.; PICHICHERO M. E.; ZITO E. T.; MACK M. E.; DAVIDSON B. L.; KAPIKIAN A. Z. Safety and efficacy of high-dose rhesus-human reassortant rotavirus vaccines-report of the National Multicenter Trial. United States Rotavirus Vaccine Efficacy Group. **Pediatrics**, v.97, n.1, p.7-13, 1996.

RHA B.; TATE J. E.; WEINTRAUB E.; HABER P.; YEN C.; PATEL M.; CORTESE M. M.; DESTEFANO F.; PARASHAR U. D. Intussusception following rotavirus vaccination: an updated review of the available evidence. **Expert Review of Vaccines**, v.13, n.11, p.1339-1348, 2014.

RUIZ-PALACIOS G. M.; PÉREZ-SCHAEL I.; VELÁZQUEZ F. R.; ABATE H.; BREUER T.; CLEMENS S. C.; CHEUVART B.; ESPINOZA F.; GILLARD P.; INNIS B. L.; CERVANTES Y.; LINHARES A. C.; LÓPEZ P.; MACÍAS-PARRA M.; ORTEGA-BARRÍA E.; RICHARDSON V.; RIVERA-MEDINA D. M.; RIVERA L.; SALINAS B.; PAVÍA-RUZ N.; SALMERÓN J.; RÜTTIMANN R.; TINOCO J. C.; RUBIO P.; NUÑEZ E.; GUERRERO M. L.; YARZÁBAL J. P.; DAMASO S.; TORNIEPORTH N.; SÁEZ-LLORENS X.; VERGARA R. F.; VESIKARI T.; BOUCKENOOGHE A.; CLEMENS R.; DE VOS B.; O'RYAN M.; HUMAN ROTAVIRUS VACCINE STUDY GROUP. Safety and efficacy of an attenuated vaccine against severe rotavirus gastroenteritis. **The New England Journal of Medicine**, v.354, n.1, p.11-22, 2006.

SÁFADI M. A.; BEREZIN E. N.; MUNFORD V.; ALMEIDA F. J.; DE MORAES J. C.; PINHEIRO C. F.; RACZ M. L. Hospital-based surveillance to evaluate the impact of rotavirus vaccination in São Paulo, Brazil. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v.29, n.11, p.1019-1022, 2010.

SANGER F.; NICKLEN S.; COULSON A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.74, n.12, p.5463-5467, 1977.

SANTOS N.; HOSHINO Y. Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. **Reviews in Medical Virology**, v.15, n.1, p.29-56, 2005.

SANTOS N. S. S.; ROMANOS M. T. V.; WIGG M. D. Víruses Entéricas. In: Introdução à Virologia Humana. São Paulo: Guanabara Koogan, p.147-160, 2008.

SANTOS R. A. T.; BORGES A. M. T.; COSTA P. S. S.; TEIXEIRA J. M. S.; GIUGLIANOL. G.; LEITE J. P. G.; CARDOSO D. D. P. Astrovirus infection in children living in the Central West region of Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.102, n.2, p.209-213, 2007.

SANTOSHAM M.; LETSON G. W.; WOLFF M.; REID R.; GAHAGAN S.; ADAMS R.; CALLAHAN C.; SACK R. B.; KAPIKIAN A. Z. A field study of the safety and efficacy of two candidate rotavirus vaccines in a Native American population. **The Journal of Infectious Diseases**, v.163, n.3, p.483-487, 1991.

SERRAVALLE K.; SANTOS N.; SARDI S. I.; SILVA S. P.; RIBEIRO JUNIOR H. DA C.; MATTOS A. P.; CAMPOS G. S. Molecular characterization of group A rotavirus isolates obtained from hospitalized children in Salvador, Bahia, Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.11, n.1, p.35-39, 2007.

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

SILVA M. F.; ROSE T. L.; GÓMEZ M. M.; CARVALHO-COSTA F. A.; FIALHO A. M.; ASSIS R. M.; ANDRADE J. DA S.; VOLOTÃO E. DE M.; LEITE J. P. G1P[8] species A rotavirus over 27 years--pre- and post-vaccination eras--in Brazil: full genomic constellation analysis and no evidence for selection pressure by Rotarix[®] vaccine. **Infection, Genetic and Evolution**, v.30, p.206-218, 2015.

SILVA M. L.; SOUZA J. R.; MELO M. M. Rotavirus prevalence in infants and children in the public healthcare system of the state of Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.43, n.5, p.548-551, 2010.

SILVA M. S.; PENNA F. J.; DUARTE R. J.; PEREIRA P. A.; CURSINO A. E.; PÉRET-FILHO L. A.; MENDES E. N.; MAGALHÃES P. P. Shift in human rotavirus distribution in Belo Horizonte, Brazil detected by ribonucleic acid electrophoresis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.55, n.2, p.137-140, 2013.

SILVA P. A.; SANTOS R. A.; COSTA P. S.; TEIXEIRA J. M.; GIUGLIANO L. G.; ANDREASI M. S.; LEITE J. P.; SCHREIER E.; CARDOSO D. D. The circulation of human astrovirus genotypes in the Central West Region of Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.104, n.4, p.655-658, 2009.

SILVESTREL S.; TARAPOREWALA Z. F.; PATTON J. T. Rotavirus replication: plus-sense templates for double-stranded RNA synthesis are made in viroplasm. **Journal of Virology**, v.78, n.14, p.7763-7774, 2004.

SILVESTRI L. S.; TORTORICI M. A.; VASQUEZ-DEL CARPIO R.; PATTON J. T. Rotavirus glycoprotein NSP4 is a modulator of viral transcription in the infected cell. **Journal of Virology**, n.79, n.24, p.15165-15174, 2005.

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

SNELLING T. L.; ANDREWS R. M.; KIRKWOOD C. D.; CULVENOR S.; CARAPETIS J. R. Case-control evaluation of the effectiveness of the G1P[8] human rotavirus vaccine during an outbreak of rotavirus G2P[4] infection in central Australia. **Clinical Infectious Disease**, v.52, n.2, p. 191-199, 2011.

SOARES S. L.; MASCARENHAS J. D'A. P.; GABBAY Y. B.; GUSMÃO R. H. P.; LINHARES A. C. Caracterização molecular de rotavírus humanos do tipo G1 detectados em crianças de Belém, Pará, Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v.1, n.1, p.125-130, 2010.

SOUSA T. T.; SOUZA M.; FIACCADORI F. S.; BORGES A. M. T.; COSTA P. S.; CARDOSO D. D. P. Human bocavirus 1 and 3 infection in children with acute gastroenteritis in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.107, n.6, p.800-804, 2012.

SOUZA M. B.; RÁCZ M. L.; LEITE J. P.; SOARES C. M.; MARTINS R. M.; MUNFORD V.; CARDOSO D. D. Molecular and serological characterization of group A rotavirus isolates obtained from hospitalized children in Goiânia, Brazil, 1998-2000. **European Journal of Clinical Microbiology Infectious Diseases**, v.22, n.7, p.441-443, 2003.

STANDAERT B.; STRENS D.; ALWAN A.; RAES M. Medium- to long-term impact of rotavirus vaccination on hospital care in Belgium: A 7-year follow-up of the rotavirus Belgium impact study (RotaBIS). **Infectious Diseases and Therapy**, v.5, n.1, p.31-44, 2016.

STEWIEN K. E.; DA CUNHA L. C.; ALVIM A. DE C.; DOS REIS FILHO S. A.; ALVIM M. A.; BRANDÃO A. A.; NEIVA M. N. Rotavirus associated diarrhoea during infancy in the city of S. Luís (MA), Brazil: a two-year longitudinal study. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.33, n.6, p.459-464, 1991.

SVENSSON L.; PADILLA-NORIEGA L.; TANIGUCHI K.; GREENBERG H. B. Lack of cosegregation of the subgroup II antigens on genes 2 and 6 in porcine rotaviruses. **Journal of Virology**, v.64, n.1, p.411-413, 1990.

TAM C. C.; O'BRIEN S. J.; TOMPKINS D. S.; BOLTON F. J.; BERRY L.; DODDS J.; CHOUDHURY D.; HALSTEAD F.; ITURRIZA-GÓMARA M.; MATHER K.; RAIT G.; RIDGE A.; RODRIGUES L. C.; WAIN J.; WOOD B.; GRAY J. J.; IID2 Study Executive Committee. Changes in causes of acute gastroenteritis in the United Kingdom over 15 years: microbiologic findings from 2 prospective, population-based studies of infectious intestinal disease. **Clinical Infectious Diseases**, v.54, n.9, p.1275-1286, 2012.

TAMURA K.; NEI M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. **Molecular Biology and Evolution**, v.10, n., p. 512-26, 1993.

TANIGUCHI K.; URASAWA T.; URASAWA S. Reactivity patterns to human rotavirus strains of a monoclonal antibody against VP2, a component of the inner capsid of rotavirus. Brief report. **Archives of Virology**, v.87, n.1-2, p.135-141, 1986.

TANIGUCHI K.; URASAWA T.; KOBAYASHI N.; GORZIGLIA M.; URASAWA S. Nucleotide sequence of VP4 and VP7 genes of human rotaviruses with subgroup I specificity and long RNA pattern: implication for new G serotype specificity. **Journal of Virology**, v.64, n.11, p.5640-5644, 1990.

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

TATE J. E.; PARASHAR U. D. Monitoring impact and effectiveness of rotavirus vaccination. **Expert Review of Vaccines**, v.10, n.8, p.1123-1125, 2011.

TATE J. E.; HAYNES A.; PAYNE D. C.; CORTESE M. M.; LOPMAN B. A.; PATEL M. M.; PARASHAR U. D. Trends in national rotavirus activity before and after introduction of rotavirus vaccine into the national immunization program in the United States, 2000 to 2012. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v.32, n.7, p.741-744, 2013.

TATE J. E.; YEN C.; STEINER C. A.; CORTESE M. M.; PARASHAR U. D. Intussusception Rates before and after the introduction of rotavirus vaccine. **Pediatrics**, v.138, n.3, p.e20161082, 2016.

TAVARES T. M.; BRITO W. M.; FIACCADORI F. S.; PARENTE J. A.; COSTA P. S.; GIUGLIANO L. G.; ANDREASI M. S.; SOARES C. M.; CARDOSO D. D. Molecular characterization of VP6-encoding gene of group A human rotavirus samples from central west region of Brazil. **Journal of Medical Virology**, v.80, n.11, p.2034-2039, 2008a.

TAVARES M. T.; BRITO W. M. E. D.; FIACCADORI F. S.; FREITAS E. R. L.; PARENTE J. A.; COSTA P. S. S.; GIUGLIANO L. G.; ANDREASI M. S. A.; SOARES C. M. A.; CARDOSO D. D. P. Molecular characterization of the NSP4 gene of human group A rotavirus samples from the West Central region of Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.103, n.3, p.288-294, 2008b.

THOMPSON J. D.; GIBSON T. J.; PLEWNIAK F.; JEANMOUGIN F.; HIGGINS D. G. The CLUSTAL X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, v.25, n.24, p.4876-4882, 1997.

TIMENETSKY M. D. C.; SANTOS N.; GOUVEA V. Survey of rotavirus G and P types associated with human gastroenteritis in São Paulo, Brazil, from 1986 to 1992. **Journal of Clinical Microbiology**, v.32, n.10, p.2622-2624, 1994.

TOM-REVZON C. Rotavirus live, oral, pentavalent vaccine. **Clinical Therapeutics**, v.29, n.12, p.2724-2737, 2007.

TORRES-VEGA M. A.; GONZÁLEZ R. A.; DUARTE M.; PONCET D.; LÓPEZ S.; ARIAS C. F. The C-terminal domain of rotavirus NSP5 is essential for its multimerization, hyperphosphorylation and interaction with NSP6. **Journal of General Virology**, v.81, n.Pt 3, p.821-830, 2000.

URASAWA T.; TANIGUCHI K.; KOBAYASHI N.; WAKASUGI F.; OISHI I.; MINEKAWA Y.; OSETO M.; AHMED M. U.; URASAWA S. Antigenic and genetic analyses of human rotavirus with dual subgroup specificity. **Journal of Clinical Microbiology**, v.28, n.12, p.2837-2841, 1990.

VARGHESE V.; GHOSH S.; DAS S.; BHATTACHARYA S. K.; KRISHNAN T.; KARMAKAR P.; KOBAYASHIN.; 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.

VASQUEZ-DEL CARPIO R.; GONZALEZ-NILO F. D.; RIADI G.; TARAPOREWALA Z. F.; PATTON J. T. Histidine triad-like motif of the rotavirus NSP2 octamer mediates both RTPase and NTPase activities. **Journal of Molecular Biology**, v.362, n.3, p.539-554, 2006.

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

VENDE P.; TARAPOREWALA Z. F.; PATTON J.T. RNA-binding activity of the rotavirus phosphoprotein NSP5 includes affinity for double-stranded RNA. **Journal of Virology**, v.76, n.10, p.5291-5299, 2002.

VESIKARI T.; ISOLAURI E.; DELEM A.; D'HONDTE.; ANDRÉ F. E.; BEARDS G. M.; FLEWETT T. H. Clinical efficacy of the RIT 4237 live attenuated bovine rotavirus vaccine in infants vaccinated before a rotavirus epidemic. **Journal of Pediatrics**, v.107, n.2, p.189-194, 1985.

VESIKARI T.; RAUTANEN T.; VARIS T.; BEARDS G. M.; KAPIKIAN A. Z. Rhesus Rotavirus candidate vaccine. Clinical trial in children vaccinated between 2 and 5 months of age. **The American Journal of Diseases of Children**, v.144, n.3, p.285-289, 1990.

VESIKARI T.; CLARK H. F.; OFFIT P. A.; DALLAS M. J.; DISTEFANO D. J.; GOVEIA M. G.; WARD R. L.; SCHÖDEL F.; KARVONEN A.; DRUMMOND J. E.; DINUBILE M. J.; HEATON P. M. Effects of the potency and composition of the multivalent human-bovine (WC3) reassortant rotavirus vaccine on efficacy, safety and immunogenicity in healthy infants. **Vaccine**, n.24, v.22, p.4821482-9, 2006.

WATERHOUSE A. M.; PROCTER J. B.; MARTIN D. M. A.; CLAMP M.; BARTON G. J. Jalview Version 2 - a multiple sequence alignment editor and analysis workbench **Bioinformatics**, v.25, n.9, p.1189-1191, 2009.

WEBB B.; SALI A. Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER. **Current Protocols in Bioinformatics**, v.47, n.5-6, p.1-32, 2014.

WELCH S. K.; CRAWFORD S. E.; ESTES M. K. Rotavirus SA11 genome segment 11 protein is a nonstructural phosphoprotein. **Journal of Virology**, v.63, n.9, p.3974-3982, 1989.

WHITFELD P. L.; TYNDALL C.; STIRZAKER S. C.; BELLAMY A. R.; BOTH G. W. Location of sequences within rotavirus SA11 glycoprotein VP7 which direct it to the endoplasmic reticulum. **Molecular and Cellular Biology**, v.7, n.7, p.2491-2497, 1987.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global plan of action for children's health and the environment (2010-2015). Disponível em: <http://www.who.int/ceh/global_plan/en/> Acesso em: 26/10/2015a.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. Diarrhoeal disease. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/en/>> Acesso em: 01/12/2015b.

WIERZBA T. F.; ABDEL-MESSIH I. A.; ABU-ELYAZEED R.; PUTNAM S. D.; KAMAL K. A.; ROZMAJZL P.; AHMED S. F.; FATAH A.; ZABEDY K.; SHAHEEN H. I.; SANDERS J.; FRENCK R. Clinic-based surveillance for bacterial- and rotavirus-associated diarrhea in Egyptian children. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.74, n.1, p.148-153, 2006.

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

WYLIE K. M.; WEINSTOCK G. M.; STORCH G. A Emergence of Rotavirus G12P[8] in St. Louis During the 2012-2013 Rotavirus Season. **Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society**, n.4, v.4, p.e84-89, 2015.

YANG H.; MAKEYEV E. V.; KANG Z.; JI S.; BAMFORD D. H.; VAN DIJK A. A. Cloning and sequence analysis of *dsRNA* segments 5, 6 and 7 of a novel non-group A, B, C adult rotavirus that caused an outbreak of gastroenteritis in China. **Virus Research**, v.106, n.1, p.15-26, 2004.

ZAMBRANO J. L.; DÍAZ Y.; PEÑA F.; VIZZI E.; RUIZ M. C.; MICHELANGELI F.; LIPRANDI F.; LUDERT J. E. Silencing of rotavirus NSP4 or VP7 expression reduces alterations in Ca²⁺ homeostasis induced by infection of cultured cells. **Journal of Virology**, v.82, n.12, p.5815-5824, 2008.

ZELLER M.; PATTON J. T.; HEYLEN E.; DE COSTER S.; CIARLET M.; VAN RANST M.; MATTHIJNSSENS J. Genetic analyses reveal differences in the VP7 and VP4 antigenic epitopes between human rotaviruses circulating in Belgium and rotaviruses in Rotarix and RotaTeq. **Journal of Clinical Microbiology**, v.50, n.3, p.966-976, 2012.

ZHANG R.; JHA B. K.; OGDEN K. M.; DONG B.; ZHAO L.; ELLIOTT R.; PATTON J. T.; SILVERMAN R. H.; WEISS S. R. Homologous 2',5'-phosphodiesterases from disparate RNA viruses antagonize antiviral innate immunity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.110, n.32, p.13114-13119, 2013.

ZHANG Y. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. **BMC Bioinformatics**, v. 9, p.40, 2008.

APÊNDICES

Apêndice I. Iniciadores utilizados nas reações de PCR para amplificação dos 11 segmentos de RVA.

Iniciador	Tamanho esperado do fragmento (pb)	Referências
VP1F	686	VARGHESE et al., 2006
VP1R		
GEN-VP2F	942	MATTHIJNSSENS et al., 2006
V2Rint1		
K-VP3F	977	MIJATOVIC-RUSTEMPASIC et al., 2011
V3Rint1		
Con2	876	GENTSCH et al., 1992
Con3		
VP6F	1.356	FUJII et al., 2012
VP6R		
VP7F	1.062	FUJII et al., 2012
VP7R		
NPS1F	1.547	FUJII et al., 2012
NSP1R		
NSP2F	1.058	FUJII et al., 2012
NSP2R		
NSP3F	1.050	FUJII et al., 2012
NSP3R		
NSP4F	739	FUJII et al., 2012
NSP4R		
NSP5F	663	FUJII et al., 2012
NSP5R		

Apêndice II. Condições de ciclagem das reações de PCR para os genes codantes das VPs e NSPs.

Gene codante da proteína	Condições da PCR					
	Desnaturação inicial	Desnaturação/anelamento/extensão			Ciclos	Extensão final
VP1 e VP2	94°C/2'	94°C/30"	50°C/30"	72°C/1'30"	40	72°C/7'
VP3	94°C/2'	94°C/30"	49°C/30"	72°C/1'30"	40	72°C/7'
VP4	94°C/5'	94°C/1'	50°C/1'	72°C/2'	35	72°C/10'
VP6	94°C/5'	94°C/1'	49°C/1'	72°C/3'	35	72°C/10'
VP7	94°C/5'	94°C/1'	52,5°C/1'	72°C/3'	35	72°C/10'
NSP1	94°C/5'	94°C/1'	55°C/1'	72°C/3'	35	72°C/10'
NSP2	94°C/5'	94°C/1'	59°C/1'	72°C/1'30"	35	72°C/10'
NSP3	94°C/5'	94°C/1'	58°C/1'	72°C/1'30"	35	72°C/10'
NSP4	94°C/5'	94°C/1'	55°C/1'	72°C/1'30"	35	72°C/10'
NSP5/6	94°C/5'	94°C/1'	61,5°C/1'	72°C/2'	35	72°C/10'

Apêndice III. *Molprobability score* para os modelos de VP7 e VP4.

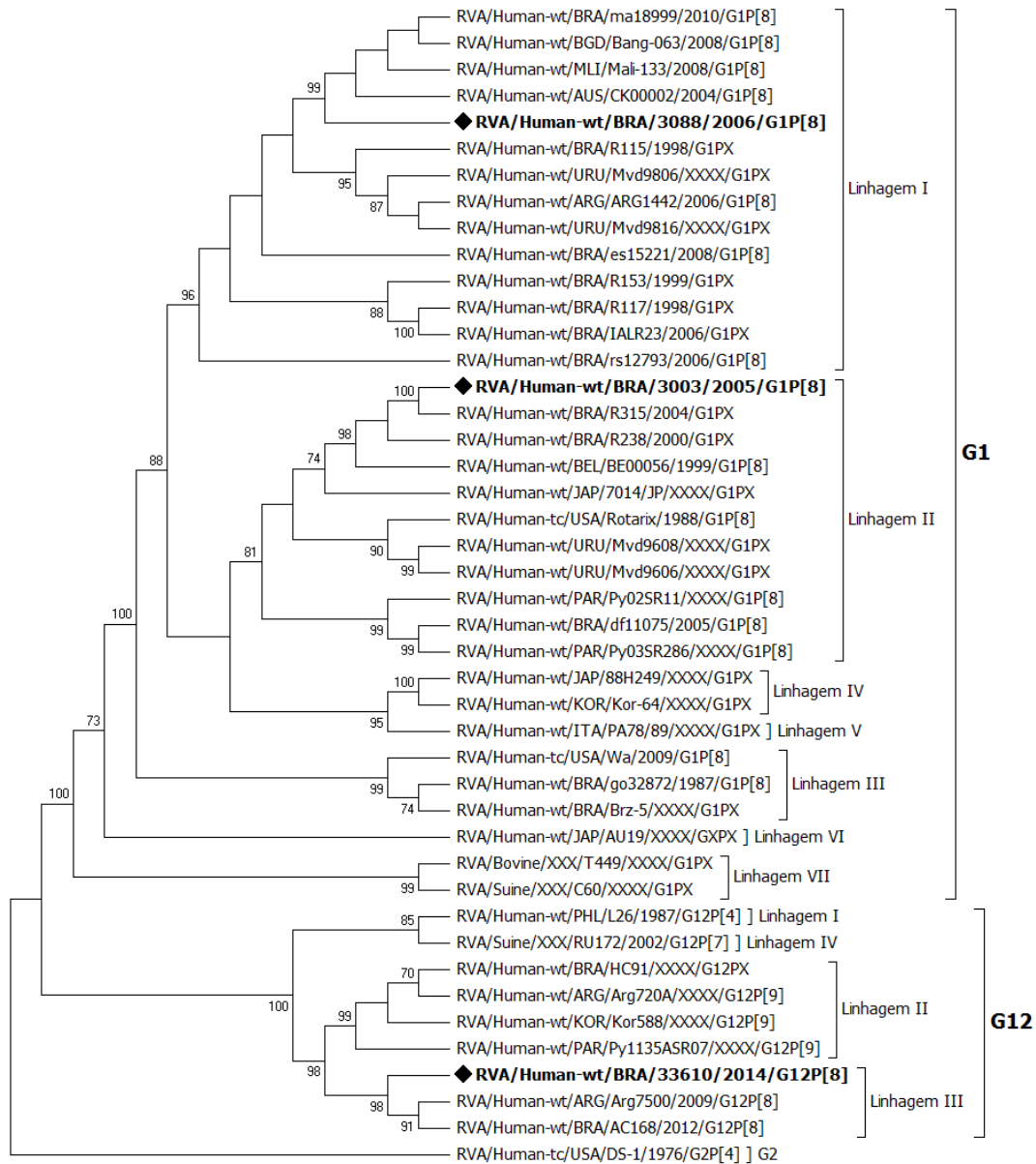
Proteínas	Modelo usado	% Identidade (% cobertura)	Clashscore [§]	MolProbability Score*	RMSD (Å)	Hélice	Folha	Outros
3003/2005/G1P[8]	3FMG_A	82 (80)	1.62 (99 th)	2.35 (56 th)	1.48	3,8	5,3	-9
3006/2006/G1P[8]	3FMG_A	80 (80)	0 (99 th)	1.50 (95 th)	6.61	-1,6	7,1	-5,4
33610/2014/G12P[8]	3FMG_A	80 (80)	0.66 (99 th)	1.35 (98 th)	4.69	-0,2	0,8	-0,5
3003/2005/G1P[8]	3IYU_X	56 (100)	1.22 (99 th)	1.55 (94 th)	2.66	1,90	-15,4	13,4
3088/2006/G1P[8]	3IYU_X	56 (100)	0.4 (99 th)	1.89 (81 th)	2.87	-2,00	-4,8	6,7
33610/2014/G12P[8]	3IYU_X	56 (100)	1.22 (99 th)	1.75 (87 th ^{&})	4.10	-1,8	-9,1	10,9

[§]*Clashscore* medida a partir do servidor MolProbability.

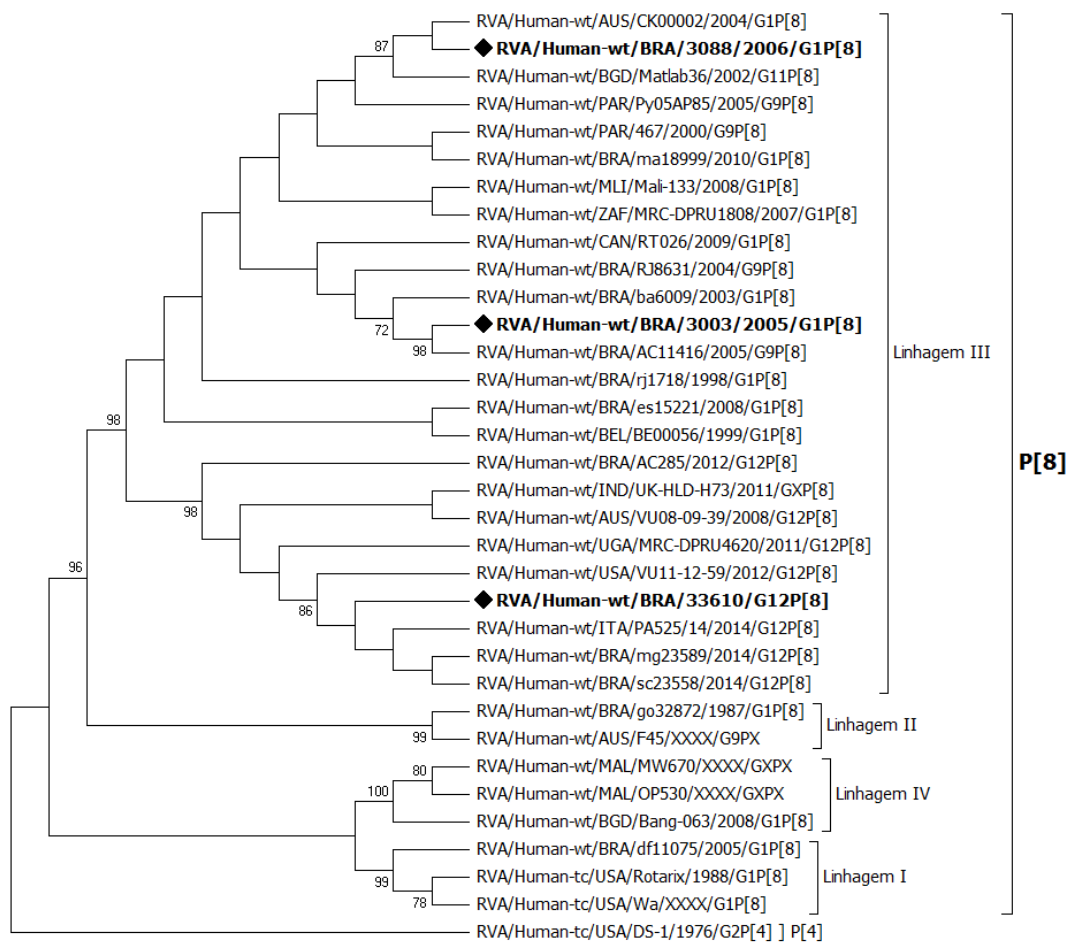
**Molprobability scores* depois das simulações de dinâmica molecular.

[&]Percent scores observado em estruturas de alta resolução.

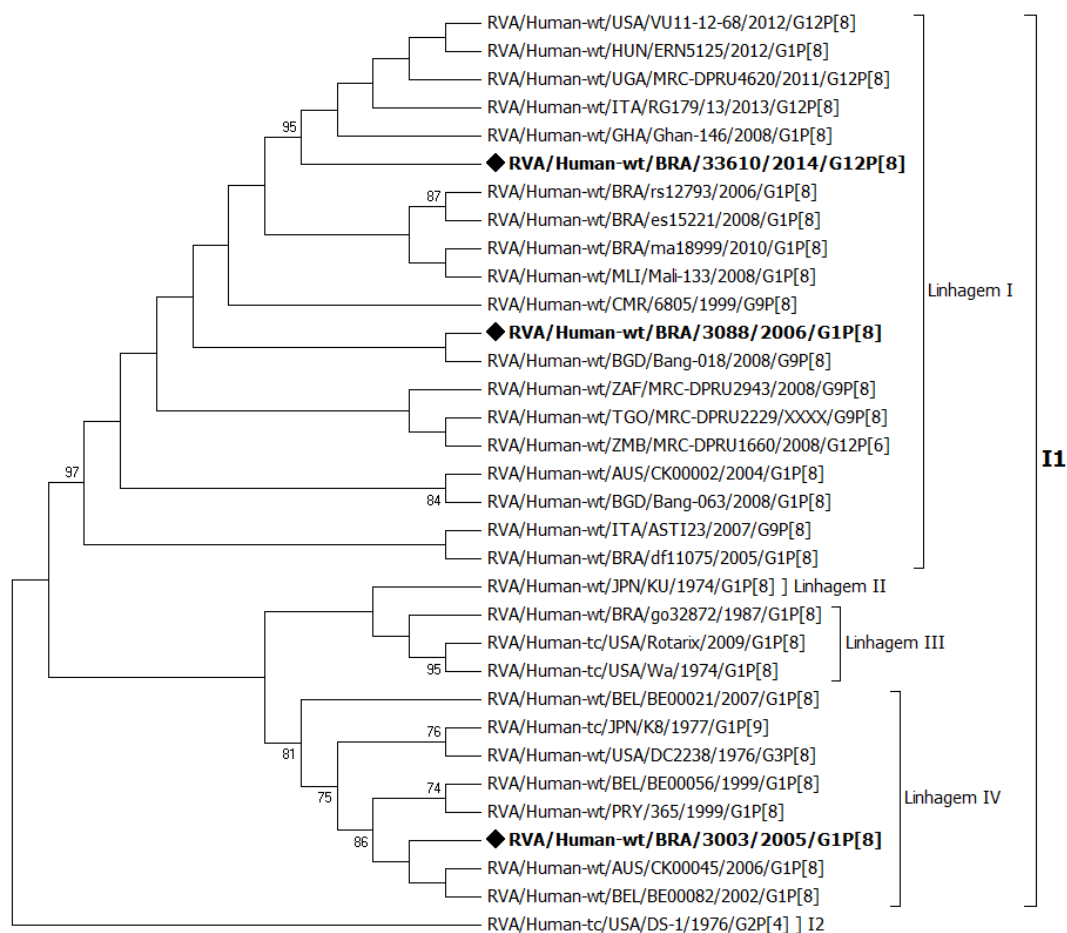
Apêndice IV. Árvores filogenéticas dos 11 segmentos de *dsRNA*.



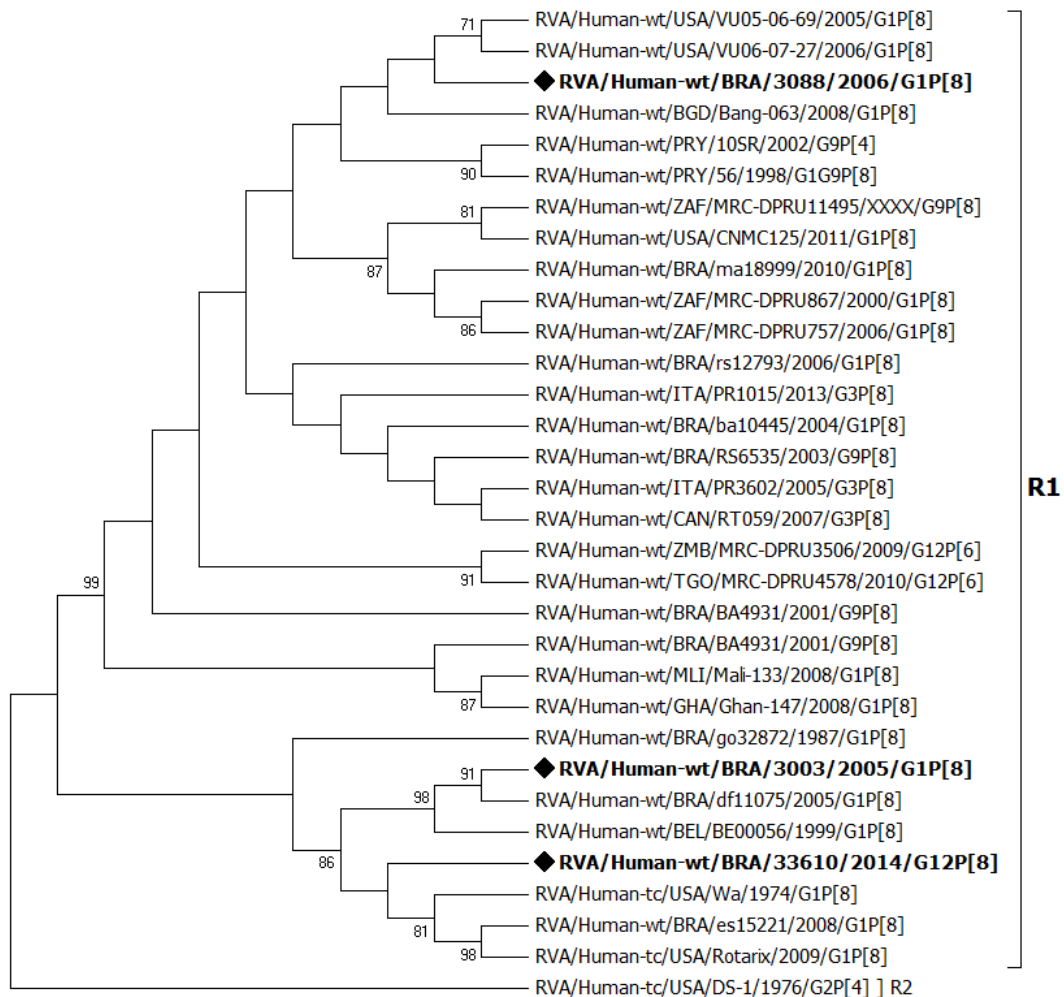
Árvore filogenética das seqüências nucleotídicas do gene de VP7 das amostras G1P[8] – 3003 (pré-vacina) e 3088 (pós-vacina) e, G12P[8]. A análise filogenética foi realizada através do programa MEGA7 (KUMAR, STECHER, TAMURA, 2016) pelo método da máxima verossimilhança baseado no modelo de HASEGAWA, KISHINO, YANO, 1985. Os nós apresentam *bootstraps* ≥ 70 .



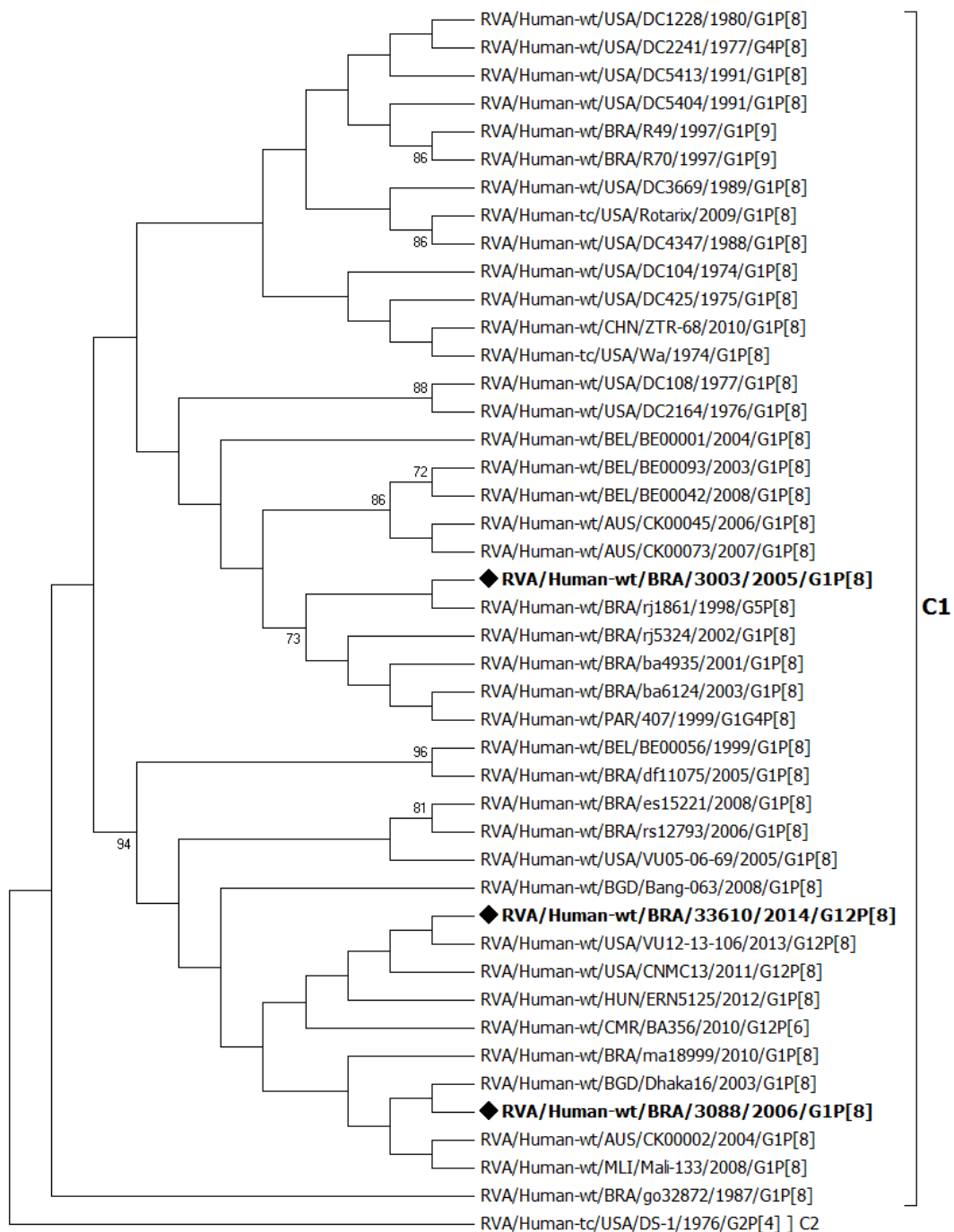
Árvore filogenética das seqüências nucleotídicas do gene de VP4 das amostras G1P[8] – 3003 (pré-vacina) e 3088 (pós-vacina) e, G12P[8]. A análise filogenética foi realizada através do programa MEGA7 (KUMAR, STECHER, TAMURA, 2016) pelo método da máxima verossimilhança baseado no modelo de HASEGAWA, KISHINO, YANO, 1985. Os nós apresentam *bootstraps* ≥ 70 .



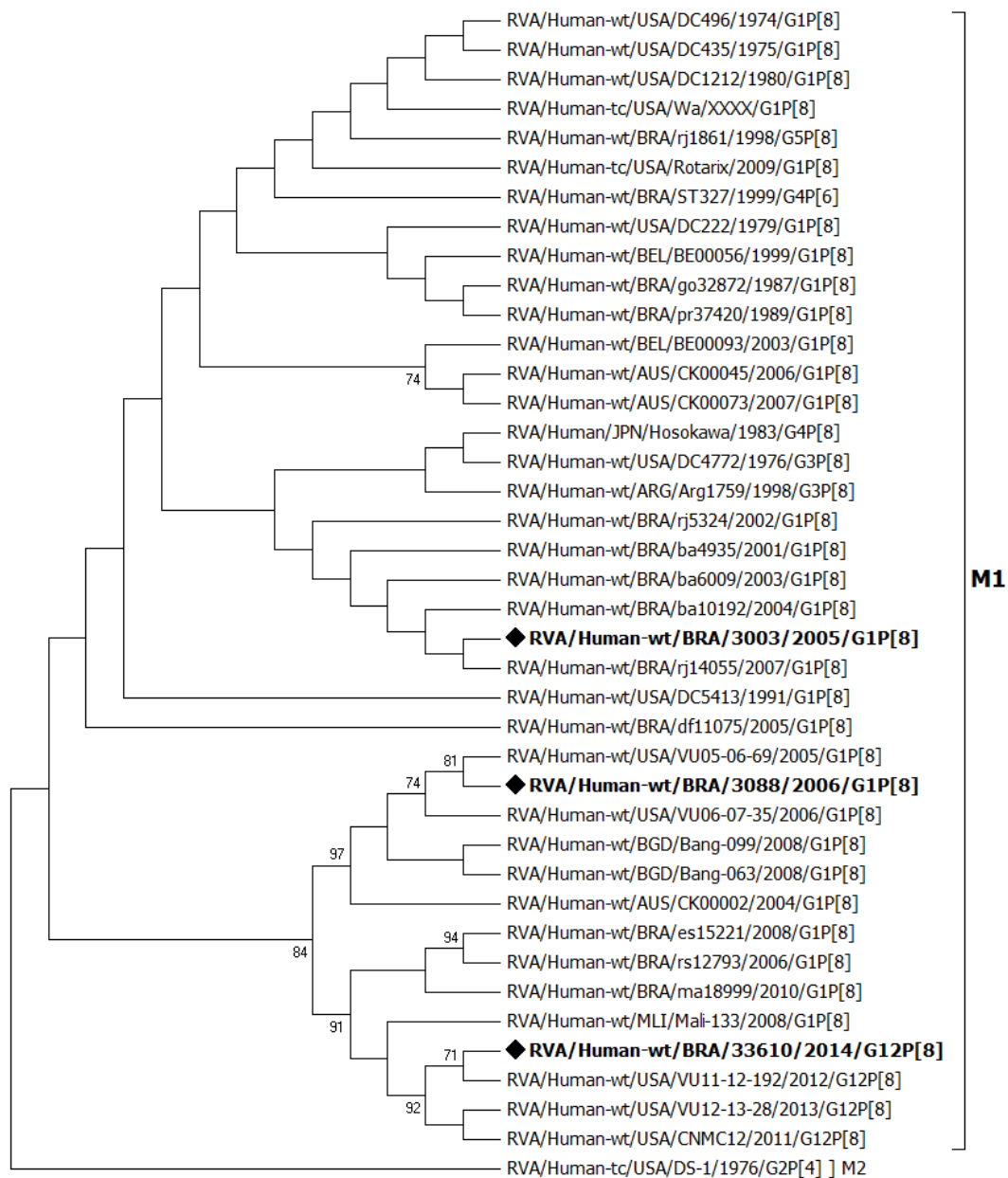
Árvore filogenética das sequências nucleotídicas do gene de VP6 das amostras G1P[8] – 3003 (pré-vacina) e 3088 (pós-vacina) e, G12P[8]. A análise filogenética foi realizada através do programa MEGA7 (KUMAR, STECHER, TAMURA, 2016) pelo método da máxima verossimilhança baseado no modelo de HASEGAWA, KISHINO, YANO, 1985. Os nós apresentam *bootstraps* ≥ 70 .



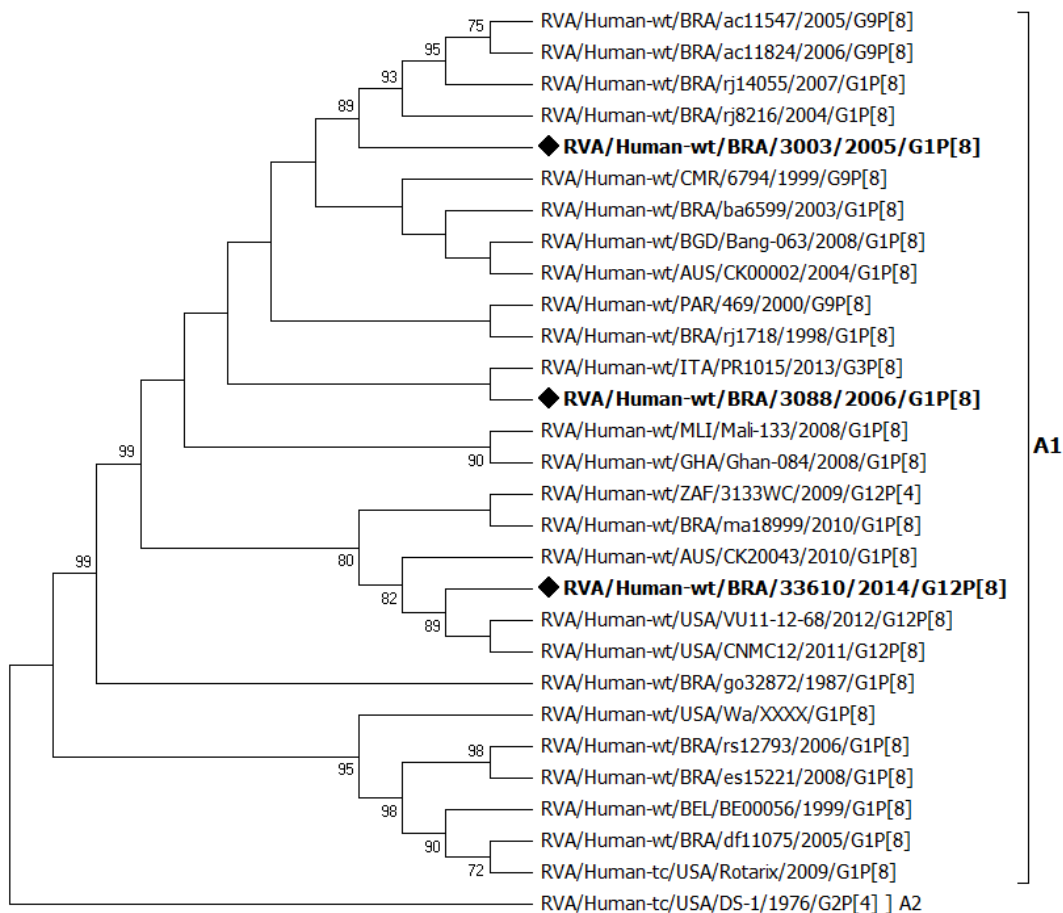
Árvore filogenética das seqüências nucleotídicas do gene de VP1 das amostras G1P[8] – 3003 (pré-vacina) e 3088 (pós-vacina) e, G12P[8]. A análise filogenética foi realizada através do programa MEGA7 (KUMAR, STECHER, TAMURA, 2016) pelo método da máxima verossimilhança baseado no modelo de TAMURA, NEI, 1983. Os nós apresentam *bootstraps* ≥ 70 .



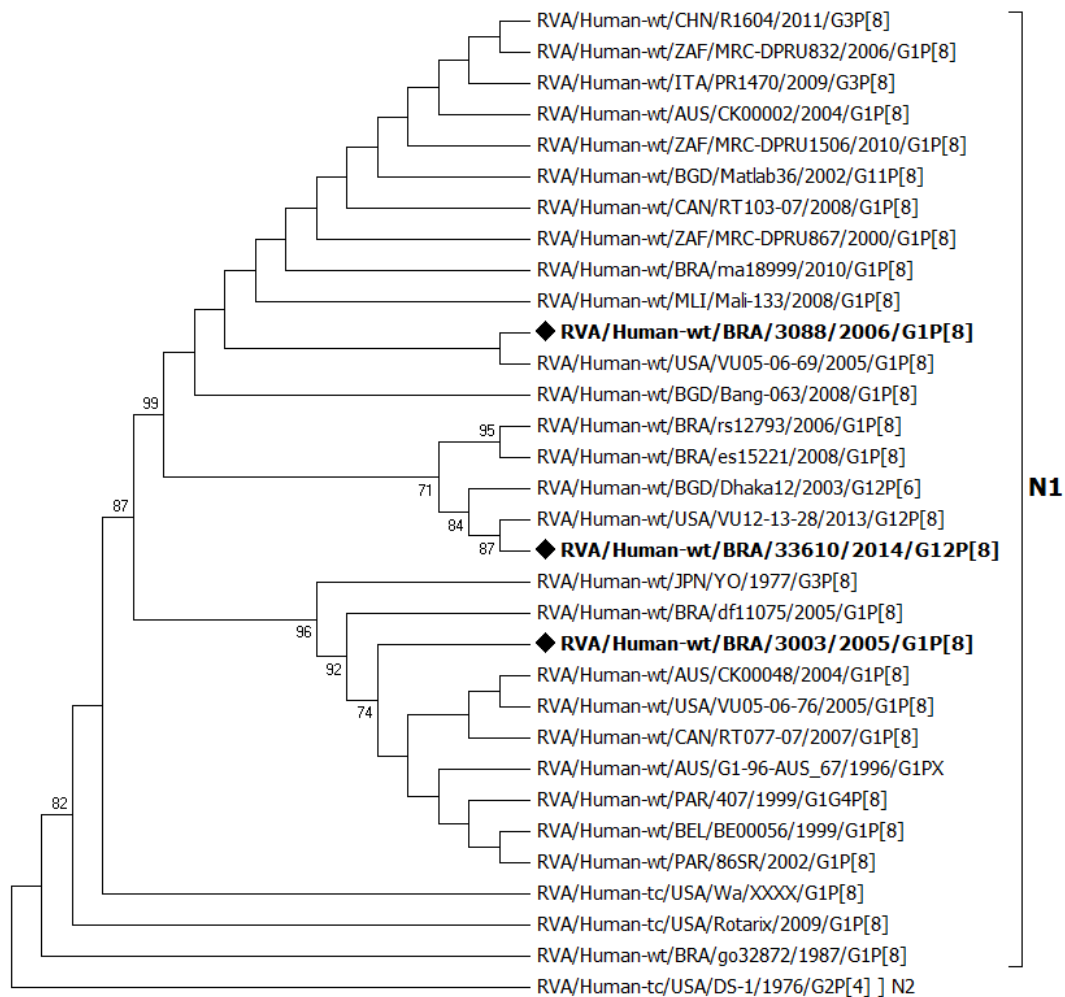
Árvore filogenética das seqüências nucleotídicas do gene de VP2 das amostras G1P[8] – 3003 (pré-vacina) e 3088 (pós-vacina) e, G12P[8]. A análise filogenética foi realizada através do programa MEGA7 (KUMAR, STECHER, TAMURA, 2016) pelo método da máxima verossimilhança baseado no modelo de TAMURA, NEI, 1983. Os nós apresentam *bootstraps* ≥ 70 .



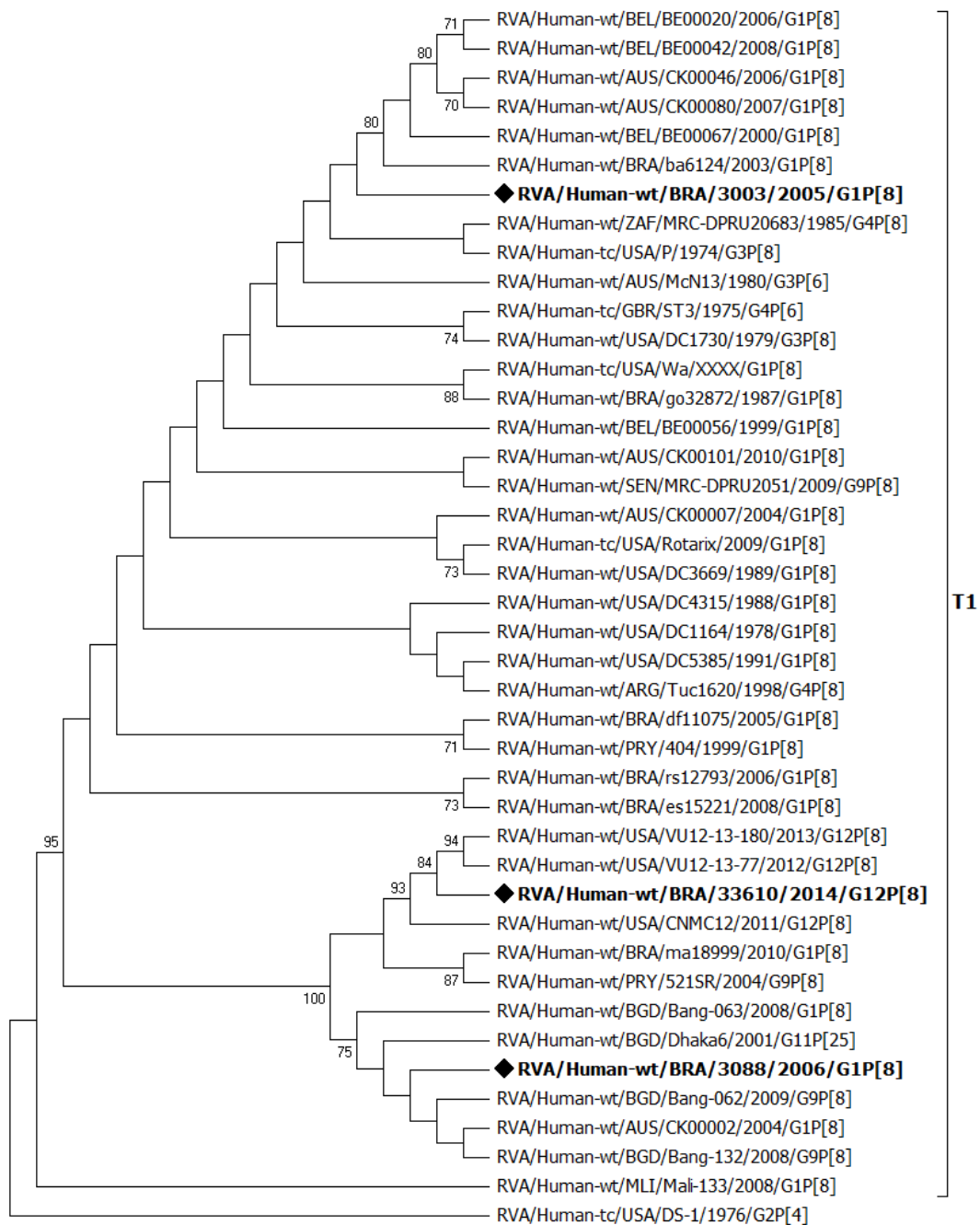
Árvore filogenética das sequências nucleotídicas do gene de VP3 das amostras G1P[8] – 3003 (pré-vacina) e 3088 (pós-vacina) e, G12P[8]. A análise filogenética foi realizada através do programa MEGA7 (KUMAR, STECHER, TAMURA, 2016) pelo método da máxima verossimilhança baseado no modelo de HASEGAWA, KISHINO, YANO, 1985. Os nós apresentam *bootstraps* ≥ 70 .



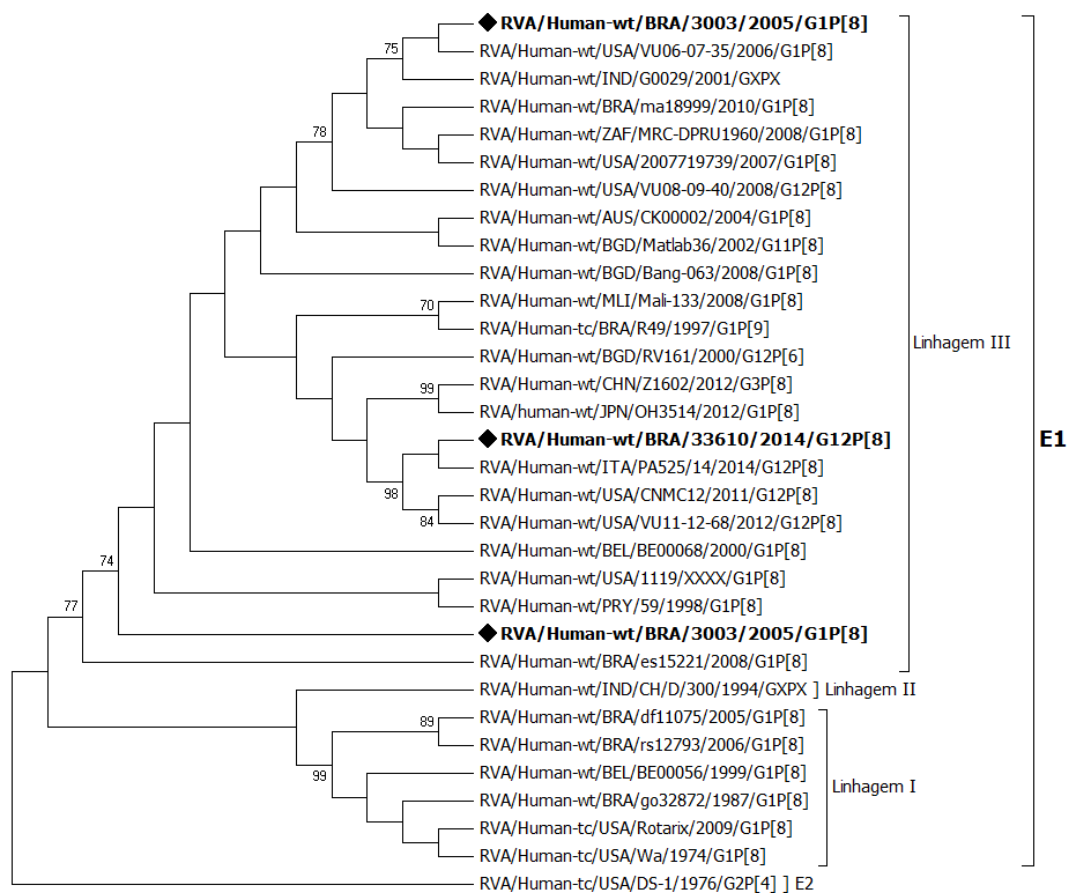
Árvore filogenética das sequências nucleotídicas do gene de NSP1 das amostras G1P[8] – 3003 (pré-vacina) e 3088 (pós-vacina) e, G12P[8]. A análise filogenética foi realizada através do programa MEGA7 (KUMAR, STECHER, TAMURA, 2016) pelo método da máxima verossimilhança baseado no modelo de HASEGAWA, KISHINO, YANO, 1985. Os nós apresentam *bootstraps* ≥ 70 .



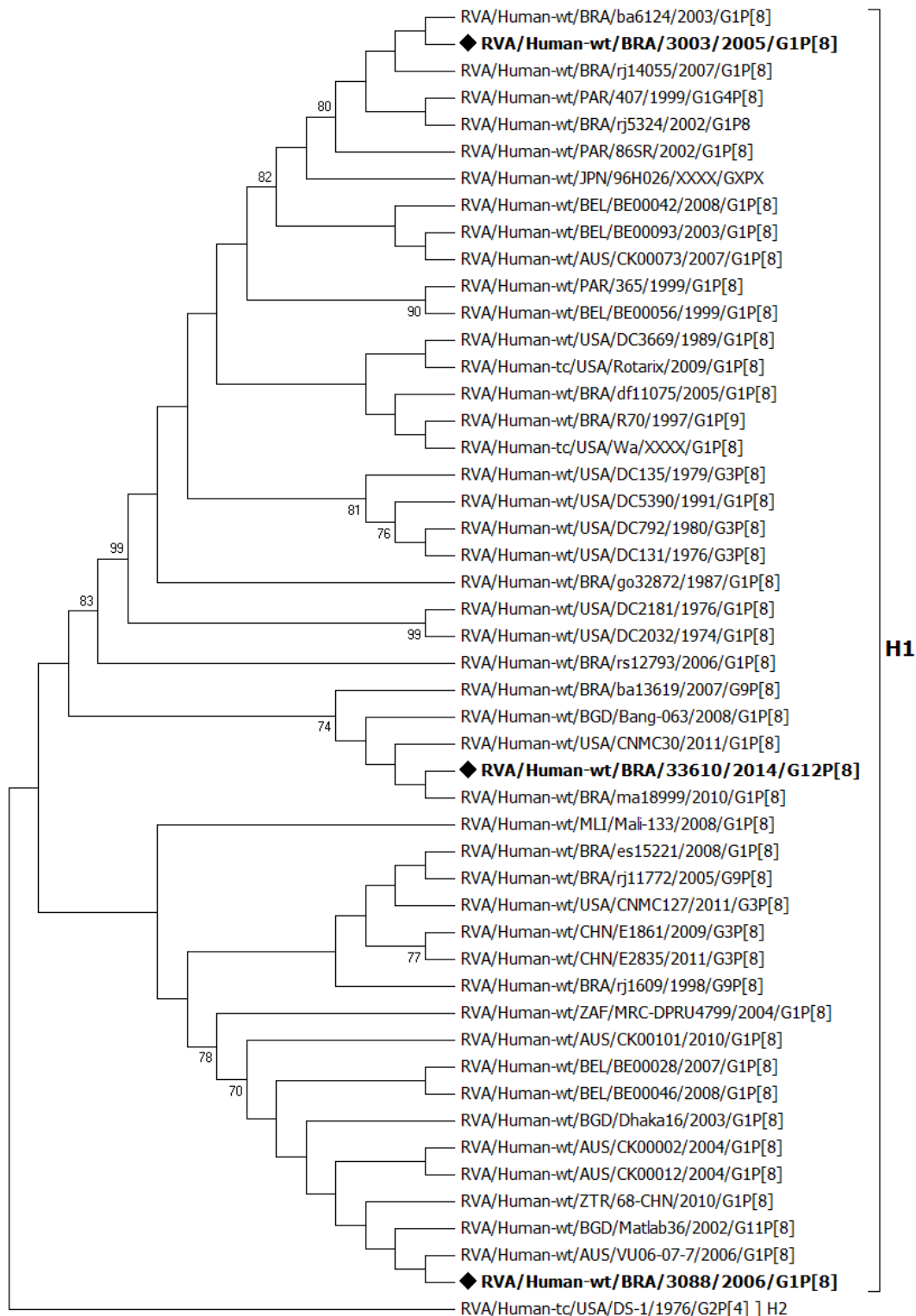
Árvore filogenética das sequências nucleotídicas do gene de NSP2 das amostras G1P[8] – 3003 (pré-vacina) e 3088 (pós-vacina) e, G12P[8]. A análise filogenética foi realizada através do programa MEGA7 (KUMAR, STECHER, TAMURA, 2016) pelo método da máxima verossimilhança baseado no modelo de HASEGAWA, KISHINO, YANO, 1985. Os nós apresentam *bootstraps* ≥ 70 .



Árvore filogenética das sequências nucleotídicas do gene de NSP3 das amostras G1P[8] – 3003 (pré-vacina) e 3088 (pós-vacina) e, G12P[8]. A análise filogenética foi realizada através do programa MEGA7 (KUMAR, STECHER, TAMURA, 2016) pelo método da máxima verossimilhança baseado no modelo de HASEGAWA, KISHINO, YANO, 1985. Os nós apresentam *bootstraps* ≥ 70 .



Árvore filogenética das sequências nucleotídicas do gene de NSP4 das amostras G1P[8] – 3003 (pré-vacina) e 3088 (pós-vacina) e, G12P[8]. A análise filogenética foi realizada através do programa MEGA7 (KUMAR, STECHER, TAMURA, 2016) pelo método da máxima verossimilhança baseado no modelo de TAMURA, NEI, 1983. Os nós apresentam *bootstraps* ≥ 70 .



Árvore filogenética das sequências nucleotídicas do gene de NSP5 das amostras G1P[8] – 3003 (pré-vacina) e 3088 (pós-vacina) e, G12P[8]. A análise filogenética foi realizada através do programa MEGA7 (KUMAR, STECHER, TAMURA, 2016) pelo método da máxima verossimilhança baseado no modelo de TAMURA, NEI, 1983. Os nós apresentam *bootstraps* ≥ 70 .

Apêndice V. Identidade de nucleotídeos e aminoácidos das amostras G1P[8], períodos pré e pós-vacina e da amostra G12P[8], período pós-vacina, em comparação a amostra Rotarix e outras depositadas no NCBI.

VP1 – Identidade de nucleotídeos

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
BGD/Bang-063/2008/G1P[8]	1	ID	98,5%	99,1%	98,8%	97,3%	98,5%	93,5%	93,5%	94,3%	93,8%	93,6%	94,6%	93,5%	93,2%
BRA/ma18999/2010/G1P[8]	2	98,5%	ID	98,3%	98,0%	96,5%	97,6%	92,3%	92,3%	93,2%	92,7%	92,5%	93,5%	92,3%	92,3%
3088/2006/G1P[8]	3	99,1%	98,3%	ID	98,8%	97,1%	98,3%	93,0%	93,2%	93,8%	93,3%	93,2%	94,1%	93,0%	92,7%
BRA/rs12793/2006/G1P[8]	4	98,8%	98,0%	98,8%	ID	97,1%	98,3%	93,3%	93,5%	94,1%	93,6%	93,5%	94,5%	93,3%	93,3%
MLI/Mali-133/2008/G1P[8]	5	97,3%	96,5%	97,1%	97,1%	ID	97,5%	92,8%	92,5%	93,3%	92,8%	92,7%	93,6%	92,5%	91,8%
AUS/CK00002/2004/G1P[8]	6	98,5%	97,6%	98,3%	98,3%	97,5%	ID	93,0%	93,0%	93,8%	93,2%	93,2%	94,1%	93,0%	93,0%
3003/2005/G1P[8]	7	93,5%	92,3%	93,0%	93,3%	92,8%	93,0%	ID	99,0%	98,5%	96,5%	96,6%	97,3%	95,6%	94,0%
BRA/df11075/2005/G1P[8]	8	93,5%	92,3%	93,2%	93,5%	92,5%	93,0%	99,0%	ID	98,8%	96,8%	97,0%	97,6%	96,0%	94,3%
BEL/BE00056/1999/G1P[8]	9	94,3%	93,2%	93,8%	94,1%	93,3%	93,8%	98,5%	98,8%	ID	97,3%	97,5%	98,1%	96,5%	95,1%
BRA/es15221/2008/G1P[8]	10	93,8%	92,7%	93,3%	93,6%	92,8%	93,2%	96,5%	96,8%	97,3%	ID	99,8%	98,8%	97,0%	94,8%
USA/Rotarix/2009/G1P[8]	11	93,6%	92,5%	93,2%	93,5%	92,7%	93,2%	96,6%	97,0%	97,5%	99,8%	ID	99,0%	97,1%	95,0%
USA/Wa/1974/G1P[8]	12	94,6%	93,5%	94,1%	94,5%	93,6%	94,1%	97,3%	97,6%	98,1%	98,8%	99,0%	ID	97,8%	96,0%
33610/2014/G12P[8]	13	93,5%	92,3%	93,0%	93,3%	92,5%	93,0%	95,6%	96,0%	96,5%	97,0%	97,1%	97,8%	ID	94,3%
BRA/go32872/1987/G1P[8]	14	93,2%	92,3%	92,7%	93,3%	91,8%	93,0%	94,0%	94,3%	95,1%	94,8%	95,0%	96,0%	94,3%	ID

VP1 – Identidade de aminoácidos

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
3003/2005/G1P[8]	1	ID	98,5%	96,5%	97,0%	98,0%	97,0%	98,0%	97,0%	97,0%	97,5%	99,0%	98,5%	97,5%	97,5%
BRA/df11075/2005/G1P[8]	2	98,5%	ID	96,5%	97,0%	98,0%	97,0%	98,0%	97,0%	97,5%	97,5%	99,0%	98,5%	97,5%	97,5%
BRA/ma18999/2010/G1P[8]	3	96,5%	96,5%	ID	97,5%	98,0%	97,0%	98,0%	97,0%	96,5%	96,5%	97,5%	97,0%	96,0%	96,0%
BRA/go32872/1987/G1P[8]	4	97,0%	97,0%	97,5%	ID	98,0%	97,0%	98,0%	97,0%	96,5%	96,5%	98,0%	97,5%	96,5%	96,5%
BRA/rs12793/2006/G1P[8]	5	98,0%	98,0%	98,0%	98,0%	ID	99,0%	100,0%	99,0%	98,5%	98,5%	99,0%	98,5%	97,5%	97,5%
AUS/CK00002/2004/G1P[8]	6	97,0%	97,0%	97,0%	97,0%	99,0%	ID	99,0%	98,0%	97,5%	97,5%	98,0%	97,5%	96,5%	96,5%
BGD/Bang-063/2008/G1P[8]	7	98,0%	98,0%	98,0%	98,0%	100,0%	99,0%	ID	99,0%	98,5%	98,5%	99,0%	98,5%	97,5%	97,5%
MLI/Mali-133/2008/G1P[8]	8	97,0%	97,0%	97,0%	97,0%	99,0%	98,0%	99,0%	ID	97,5%	97,5%	98,0%	97,5%	96,5%	96,5%
3088/2006/G1P[8]	9	97,0%	97,5%	96,5%	96,5%	98,5%	97,5%	98,5%	97,5%	ID	97,0%	97,5%	97,0%	96,0%	96,0%
33610/2014/G12P[8]	10	97,5%	97,5%	96,5%	96,5%	98,5%	97,5%	98,5%	97,5%	97,0%	ID	98,5%	98,0%	97,0%	97,0%
USA/Wa/1974/G1P[8]	11	99,0%	99,0%	97,5%	98,0%	99,0%	98,0%	99,0%	98,0%	97,5%	98,5%	ID	99,5%	98,5%	98,5%
BEL/BE00056/1999/G1P[8]	12	98,5%	98,5%	97,0%	97,5%	98,5%	97,5%	98,5%	97,5%	97,0%	98,0%	99,5%	ID	98,0%	98,0%
BRA/es15221/2008/G1P[8]	13	97,5%	97,5%	96,0%	96,5%	97,5%	96,5%	97,5%	96,5%	96,0%	97,0%	98,5%	98,0%	ID	100,0%
USA/Rotarix/2009/G1P[8]	14	97,5%	97,5%	96,0%	96,5%	97,5%	96,5%	97,5%	96,5%	96,0%	97,0%	98,5%	98,0%	100,0%	ID

VP2 - Identidade de nucleotídeos

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
3003/2005/G1P[8]	1	ID	94,4%	95,9%	90,0%	91,0%	91,4%	92,2%	90,7%	90,3%	92,7%	92,2%	87,8%	87,6%	85,5%
BRA/df11075/2005/G1P[8]	2	94,4%	ID	94,4%	90,8%	90,2%	92,2%	91,3%	89,9%	89,5%	91,9%	91,3%	84,9%	84,6%	82,7%
BEL/BE00056/1999/G1P[8]	3	95,9%	94,4%	ID	91,7%	92,7%	93,1%	93,9%	92,2%	92,0%	94,5%	93,9%	87,6%	87,3%	85,3%
BGD/Bang-063/2008/G1P[8]	4	90,0%	90,8%	91,7%	ID	96,5%	98,2%	97,1%	95,4%	94,9%	96,0%	95,4%	86,0%	85,1%	84,8%
BRA/ma18999/2010/G1P[8]	5	91,0%	90,2%	92,7%	96,5%	ID	97,7%	98,2%	96,5%	96,0%	96,5%	95,9%	87,0%	86,1%	85,8%
AUS/CK00002/2004/G1P[8]	6	91,4%	92,2%	93,1%	98,2%	97,7%	ID	98,5%	97,1%	96,6%	96,8%	96,2%	87,1%	86,2%	86,2%
3088/2006/G1P[8]	7	92,2%	91,3%	93,9%	97,1%	98,2%	98,5%	ID	97,4%	96,8%	97,6%	97,1%	87,6%	86,7%	87,0%
33610/2014/G12P[8]	8	90,7%	89,9%	92,2%	95,4%	96,5%	97,1%	97,4%	ID	95,4%	95,6%	95,1%	87,3%	86,4%	86,4%
MLI/Mali-133/2008/G1P[8]	9	90,3%	89,5%	92,0%	94,9%	96,0%	96,6%	96,8%	95,4%	ID	95,1%	94,6%	85,5%	84,7%	85,2%
BRA/es15221/2008/G1P[8]	10	92,7%	91,9%	94,5%	96,0%	96,5%	96,8%	97,6%	95,6%	95,1%	ID	99,4%	89,0%	88,1%	86,7%
BRA/rs12793/2006/G1P[8]	11	92,2%	91,3%	93,9%	95,4%	95,9%	96,2%	97,1%	95,1%	94,6%	99,4%	ID	88,4%	87,6%	86,7%
USA/Rotarix/2009/G1P[8]	12	87,8%	84,9%	87,6%	86,0%	87,0%	87,1%	87,6%	87,3%	85,5%	89,0%	88,4%	ID	98,5%	91,0%
USA/Wa/1974/G1P[8]	13	87,6%	84,6%	87,3%	85,1%	86,1%	86,2%	86,7%	86,4%	84,7%	88,1%	87,6%	98,5%	ID	91,3%
BRA/go32872/1987/G1P[8]	14	85,5%	82,7%	85,3%	84,8%	85,8%	86,2%	87,0%	86,4%	85,2%	86,7%	86,7%	91,0%	91,3%	ID

VP2 - Identidade de aminoácidos

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
BRA/df11075/2005/G1P[8]	1	ID	94,1%	94,1%	90,7%	93,2%	93,2%	90,7%	91,5%	92,4%	92,4%	91,5%	86,5%	85,7%	88,2%
3003/2005/G1P[8]	2	94,1%	ID	94,7%	91,3%	90,5%	92,2%	91,3%	92,1%	92,2%	93,0%	92,1%	87,8%	86,9%	89,5%
BEL/BE00056/1999/G1P[8]	3	94,1%	94,7%	ID	93,0%	92,3%	93,9%	93,0%	93,9%	93,9%	94,7%	93,0%	87,8%	86,9%	89,5%
BRA/ma18999/2010/G1P[8]	4	90,7%	91,3%	93,0%	ID	96,5%	97,4%	96,5%	97,3%	97,4%	98,2%	96,5%	86,9%	87,8%	88,6%
MLI/Mali-133/2008/G1P[8]	5	93,2%	90,5%	92,3%	96,5%	ID	98,2%	95,7%	96,5%	97,4%	97,4%	95,7%	86,3%	87,1%	88,0%
AUS/CK00002/2004/G1P[8]	6	93,2%	92,2%	93,9%	97,4%	98,2%	ID	97,4%	98,2%	98,2%	99,1%	97,4%	87,9%	88,7%	89,6%
BRA/rs12793/2006/G1P[8]	7	90,7%	91,3%	93,0%	96,5%	95,7%	97,4%	ID	99,1%	97,4%	98,2%	96,5%	86,9%	87,8%	88,6%
BRA/es15221/2008/G1P[8]	8	91,5%	92,1%	93,9%	97,3%	96,5%	98,2%	99,1%	ID	98,2%	99,1%	97,3%	87,8%	88,6%	89,5%
BGD/Bang-063/2008/G1P[8]	9	92,4%	92,2%	93,9%	97,4%	97,4%	98,2%	97,4%	98,2%	ID	99,1%	97,4%	87,9%	88,7%	89,6%
3088/2006/G1P[8]	10	92,4%	93,0%	94,7%	98,2%	97,4%	99,1%	98,2%	99,1%	99,1%	ID	98,2%	88,6%	89,5%	90,4%
33610/2014/G12P[8]	11	91,5%	92,1%	93,0%	96,5%	95,7%	97,4%	96,5%	97,3%	97,4%	98,2%	ID	87,8%	89,5%	89,5%
USA/Wa/1974/G1P[8]	12	86,5%	87,8%	87,8%	86,9%	86,3%	87,9%	86,9%	87,8%	87,9%	88,6%	87,8%	ID	97,2%	98,1%
USA/Rotarix/2009/G1P[8]	13	85,7%	86,9%	86,9%	87,8%	87,1%	88,7%	87,8%	88,6%	88,7%	89,5%	89,5%	97,2%	ID	97,2%
BRA/go32872/1987/G1P[8]	14	88,2%	89,5%	89,5%	88,6%	88,0%	89,6%	88,6%	89,5%	89,6%	90,4%	89,5%	98,1%	97,2%	ID

VP3 - Identidade de nucleotídeos

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
BRA/go32872/1987/G1P[8]	1	ID	98,0%	98,2%	98,7%	97,8%	96,3%	91,4%	90,9%	91,9%	91,4%	91,9%	92,1%	91,9%	92,4%
BEL/BE00056/1999/G1P[8]	2	98,0%	ID	97,3%	97,8%	96,8%	95,3%	90,9%	90,9%	91,4%	91,2%	91,7%	91,4%	91,2%	92,1%
USA/Rotarix/2009/G1P[8]	3	98,2%	97,3%	ID	99,0%	97,5%	96,5%	91,7%	91,2%	92,1%	92,1%	92,6%	92,9%	92,6%	93,1%
USA/Wa/1974/G1P[8]	4	98,7%	97,8%	99,0%	ID	98,0%	97,0%	92,1%	91,7%	92,6%	92,1%	92,6%	92,9%	92,6%	93,1%
3003/2005/G1P[8]	5	97,8%	96,8%	97,5%	98,0%	ID	96,0%	91,2%	90,7%	91,7%	91,7%	92,1%	92,9%	92,6%	92,1%
BRA/df11075/2005/G1P[8]	6	96,3%	95,3%	96,5%	97,0%	96,0%	ID	91,4%	91,4%	91,9%	91,9%	92,4%	92,9%	92,6%	92,4%
3088/2006/G1P[8]	7	91,4%	90,9%	91,7%	92,1%	91,2%	91,4%	ID	98,0%	98,5%	92,6%	93,1%	91,9%	92,1%	93,1%
BGD/Bang-063/2008/G1P[8]	8	90,9%	90,9%	91,2%	91,7%	90,7%	91,4%	98,0%	ID	98,5%	92,6%	93,1%	92,1%	92,4%	93,1%
AUS/CK00002/2004/G1P[8]	9	91,9%	91,4%	92,1%	92,6%	91,7%	91,9%	98,5%	98,5%	ID	93,6%	94,1%	92,9%	93,1%	94,1%
33610/2014/G12P[8]	10	91,4%	91,2%	92,1%	92,1%	91,7%	91,9%	92,6%	92,6%	93,6%	ID	98,0%	97,3%	97,5%	97,5%
MLI/Mali-133/2008/G1P[8]	11	91,9%	91,7%	92,6%	92,6%	92,1%	92,4%	93,1%	93,1%	94,1%	98,0%	ID	97,3%	97,5%	97,5%
BRA/rs12793/2006/G1P[8]	12	92,1%	91,4%	92,9%	92,9%	92,9%	92,9%	91,9%	92,1%	92,9%	97,3%	97,3%	ID	99,7%	96,8%
BRA/es15221/2008/G1P[8]	13	91,9%	91,2%	92,6%	92,6%	92,6%	92,6%	92,1%	92,4%	93,1%	97,5%	97,5%	99,7%	ID	97,0%
BRA/ma18999/2010/G1P[8]	14	92,4%	92,1%	93,1%	93,1%	92,1%	92,4%	93,1%	93,1%	94,1%	97,5%	97,5%	96,8%	97,0%	ID

VP3 - Identidade de aminoácidos

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
BEL/BE00056/1999/G1P[8]	1	ID	97,7%	97,0%	97,0%	97,0%	97,7%	95,5%	94,1%	94,8%	94,8%	94,8%	95,5%	95,5%	95,5%
BRA/go32872/1987/G1P[8]	2	97,7%	ID	97,7%	97,7%	97,7%	98,5%	96,3%	94,1%	95,5%	95,5%	95,5%	94,8%	94,8%	94,8%
BRA/df11075/2005/G1P[8]	3	97,0%	97,7%	ID	98,5%	98,5%	99,2%	97,0%	94,8%	96,3%	96,3%	96,3%	95,5%	95,5%	95,5%
3003/2005/G1P[8]	4	97,0%	97,7%	98,5%	ID	98,5%	99,2%	97,0%	94,8%	96,3%	96,3%	96,3%	95,5%	95,5%	95,5%
USA/Rotarix/2009/G1P[8]	5	97,0%	97,7%	98,5%	98,5%	ID	99,2%	97,0%	94,8%	96,3%	96,3%	96,3%	95,5%	95,5%	95,5%
USA/Wa/1974/G1P[8]	6	97,7%	98,5%	99,2%	99,2%	99,2%	ID	97,7%	95,5%	97,0%	97,0%	97,0%	96,3%	96,3%	96,3%
BGD/Bang-063/2008/G1P[8]	7	95,5%	96,3%	97,0%	97,0%	97,0%	97,7%	ID	97,7%	98,5%	97,7%	97,7%	97,0%	97,0%	97,0%
3088/2006/G1P[8]	8	94,1%	94,1%	94,8%	94,8%	94,8%	95,5%	97,7%	ID	96,3%	95,5%	95,5%	94,8%	94,8%	94,8%
AUS/CK00002/2004/G1P[8]	9	94,8%	95,5%	96,3%	96,3%	96,3%	97,0%	98,5%	96,3%	ID	97,7%	97,7%	97,0%	97,0%	97,0%
BRA/rs12793/2006/G1P[8]	10	94,8%	95,5%	96,3%	96,3%	96,3%	97,0%	97,7%	95,5%	97,7%	ID	100,0%	97,7%	97,7%	97,7%
BRA/es15221/2008/G1P[8]	11	94,8%	95,5%	96,3%	96,3%	96,3%	97,0%	97,7%	95,5%	97,7%	100,0%	ID	97,7%	97,7%	97,7%
MLI/Mali-133/2008/G1P[8]	12	95,5%	94,8%	95,5%	95,5%	95,5%	96,3%	97,0%	94,8%	97,0%	97,7%	97,7%	ID	98,5%	98,5%
BRA/ma18999/2010/G1P[8]	13	95,5%	94,8%	95,5%	95,5%	95,5%	96,3%	97,0%	94,8%	97,0%	97,7%	97,7%	98,5%	ID	98,5%
33610/2014/G12P[8]	14	95,5%	94,8%	95,5%	95,5%	95,5%	96,3%	97,0%	94,8%	97,0%	97,7%	97,7%	98,5%	98,5%	ID

VP4 - Identidade de nucleotídeos

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
USA/Wa/1974/G1P[8]	1	ID	98,3%	96,9%	90,1%	89,6%	90,7%	90,8%	90,5%	90,4%	90,2%	89,4%	90,4%	93,2%	88,9%
USA/Rotarix/1988/G1P[8]	2	98,3%	ID	97,3%	90,1%	89,6%	90,7%	90,8%	90,5%	90,4%	90,0%	89,3%	90,0%	93,2%	88,2%
BRA/df11075/2005/G1P[8]	3	96,9%	97,3%	ID	89,8%	89,3%	90,4%	90,5%	90,2%	90,1%	90,0%	89,0%	89,4%	94,0%	87,3%
BEL/BE00056/1999/G1P[8]	4	90,1%	90,1%	89,8%	ID	96,9%	97,8%	97,9%	97,3%	97,3%	96,2%	95,8%	93,2%	94,4%	86,2%
BRA/es15221/2008/G1P[8]	5	89,6%	89,6%	89,3%	96,9%	ID	97,3%	97,4%	96,9%	96,4%	95,9%	95,2%	92,5%	95,0%	86,7%
AUS/CK00002/2004/G1P[8]	6	90,7%	90,7%	90,4%	97,8%	97,3%	ID	99,5%	98,5%	98,3%	97,3%	96,3%	93,2%	95,2%	87,0%
3088/2006/G1P[8]	7	90,8%	90,8%	90,5%	97,9%	97,4%	99,5%	ID	98,6%	98,5%	97,4%	96,4%	93,3%	95,4%	87,1%
BRA/ma18999/2010/G1P[8]	8	90,5%	90,5%	90,2%	97,3%	96,9%	98,5%	98,6%	ID	97,7%	96,6%	95,6%	93,6%	94,8%	87,1%
MLI/Mali-133/2008/G1P[8]	9	90,4%	90,4%	90,1%	97,3%	96,4%	98,3%	98,5%	97,7%	ID	96,6%	95,8%	93,2%	94,4%	86,9%
3003/2005/G1P[8]	10	90,2%	90,0%	90,0%	96,2%	95,9%	97,3%	97,4%	96,6%	96,6%	ID	94,8%	92,5%	94,7%	86,3%
33610/2014/G12P[8]	11	89,4%	89,3%	89,0%	95,8%	95,2%	96,3%	96,4%	95,6%	95,8%	94,8%	ID	92,5%	93,5%	85,9%
BRA/go32872/1987/G1P[8]	12	90,4%	90,0%	89,4%	93,2%	92,5%	93,2%	93,3%	93,6%	93,2%	92,5%	92,5%	ID	91,2%	87,4%
BRA/rs12793/2006/G1P[8]	13	93,2%	93,2%	94,0%	94,4%	95,0%	95,2%	95,4%	94,8%	94,4%	94,7%	93,5%	91,2%	ID	87,8%
BGD/Bang-063/2008/G1P[8]	14	88,9%	88,2%	87,3%	86,2%	86,7%	87,0%	87,1%	87,1%	86,9%	86,3%	85,9%	87,4%	87,8%	ID

VP4 - Identidade de aminoácidos

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
BRA/df11075/2005/G1P[8]	1	ID	98,3%	97,5%	96,7%	91,0%	91,0%	91,4%	91,4%	91,4%	91,4%	90,6%	89,0%	91,9%	89,0%	
USA/Rotarix/1988/G1P[8]	2	98,3%	ID	97,5%	96,3%	90,6%	91,0%	91,0%	91,0%	91,0%	91,0%	90,2%	89,0%	91,9%	88,6%	
USA/Wa/1974/G1P[8]	3	97,5%	97,5%	ID	95,9%	90,2%	90,6%	90,6%	90,6%	90,6%	90,6%	89,8%	89,0%	91,9%	88,6%	
BRA/rs12793/2006/G1P[8]	4	96,7%	96,3%	95,9%	ID	93,9%	93,9%	94,7%	94,7%	94,7%	94,7%	93,9%	91,9%	93,9%	89,8%	
3003/2005/G1P[8]	5	91,0%	90,6%	90,2%	93,9%	ID	96,7%	96,7%	96,7%	96,7%	95,5%	95,1%	93,5%	93,9%	86,2%	
MLI/Mali-133/2008/G1P[8]	6	91,0%	91,0%	90,6%	93,9%	96,7%	ID	98,3%	98,3%	98,3%	97,1%	96,3%	95,5%	95,1%	87,8%	
3088/2006/G1P[8]	7	91,4%	91,0%	90,6%	94,7%	96,7%	98,3%	ID	99,1%	99,1%	97,9%	97,1%	95,5%	95,1%	88,6%	
AUS/CK00002/2004/G1P[8]	8	91,4%	91,0%	90,6%	94,7%	96,7%	98,3%	99,1%	ID	99,1%	97,9%	97,1%	95,5%	95,1%	88,6%	
BRA/ma18999/2010/G1P[8]	9	91,4%	91,0%	90,6%	94,7%	96,7%	98,3%	99,1%	99,1%	ID	97,9%	97,1%	95,5%	95,1%	88,6%	
BRA/es15221/2008/G1P[8]	10	91,4%	91,0%	90,6%	94,7%	95,5%	97,1%	97,9%	97,9%	97,9%	ID	97,1%	95,1%	94,7%	89,0%	
BEL/BE00056/1999/G1P[8]	11	90,6%	90,2%	89,8%	93,9%	95,1%	96,3%	97,1%	97,1%	97,1%	97,1%	ID	94,7%	93,9%	87,8%	
33610/2014/G12P[8]	12	89,0%	89,0%	89,0%	91,9%	93,5%	95,5%	95,5%	95,5%	95,5%	95,5%	95,1%	94,7%	ID	93,9%	86,6%
BRA/go32872/1987/G1P[8]	13	91,9%	91,9%	91,9%	93,9%	93,9%	95,1%	95,1%	95,1%	95,1%	94,7%	93,9%	93,9%	ID	88,2%	
KP881989-RVA/19-265	14	89,0%	88,6%	88,6%	89,8%	86,2%	87,8%	88,6%	88,6%	88,6%	89,0%	87,8%	86,6%	88,2%	ID	

VP6 - Identidade de nucleotídeos

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
BRA/rs12793/2006/G1P[8]	1	ID	100,0%	97,1%	97,6%	97,6%	97,6%	98,1%	97,6%	96,6%	88,6%	88,1%	85,7%	89,5%	89,5%
BRA/es15221/2008/G1P[8]	2	100,0%	ID	97,1%	97,6%	97,6%	97,6%	98,1%	97,6%	96,6%	88,6%	88,1%	85,7%	89,5%	89,5%
AUS/CK00002/2004/G1P[8]	3	97,1%	97,1%	ID	99,5%	97,6%	95,7%	96,2%	95,7%	96,2%	89,0%	88,6%	87,2%	89,0%	89,0%
BGD/Bang-063/2008/G1P[8]	4	97,6%	97,6%	99,5%	ID	98,1%	96,2%	96,6%	96,2%	96,6%	89,5%	89,0%	87,6%	89,5%	89,5%
3088/2006/G1P[8]	5	97,6%	97,6%	97,6%	98,1%	ID	97,1%	96,6%	96,2%	95,7%	88,6%	88,1%	85,7%	89,5%	89,5%
33610/2014/G12P[8]	6	97,6%	97,6%	95,7%	96,2%	97,1%	ID	95,7%	95,2%	94,7%	86,7%	86,2%	83,8%	87,6%	87,6%
BRA/ma18999/2010/G1P[8]	7	98,1%	98,1%	96,2%	96,6%	96,6%	95,7%	ID	97,6%	94,7%	87,6%	87,2%	85,7%	89,5%	89,5%
MLI/Mali-133/2008/G1P[8]	8	97,6%	97,6%	95,7%	96,2%	96,2%	95,2%	97,6%	ID	96,2%	90,0%	89,5%	87,2%	90,0%	90,0%
BRA/df11075/2005/G1P[8]	9	96,6%	96,6%	96,2%	96,6%	95,7%	94,7%	94,7%	96,2%	ID	90,0%	89,5%	87,6%	89,5%	89,5%
3003/2005/G1P[8]	10	88,6%	88,6%	89,0%	89,5%	88,6%	86,7%	87,6%	90,0%	90,0%	ID	99,5%	93,3%	94,3%	93,3%
BEL/BE00056/1999/G1P[8]	11	88,1%	88,1%	88,6%	89,0%	88,1%	86,2%	87,2%	89,5%	89,5%	99,5%	ID	92,8%	93,8%	92,8%
BRA/go32872/1987/G1P[8]	12	85,7%	85,7%	87,2%	87,6%	85,7%	83,8%	85,7%	87,2%	87,6%	93,3%	92,8%	ID	92,4%	91,4%
USA/Wa/1974/G1P[8]	13	89,5%	89,5%	89,0%	89,5%	89,5%	87,6%	89,5%	90,0%	89,5%	94,3%	93,8%	92,4%	ID	99,0%
USA/Rotarix/2009/G1P[8]	14	89,5%	89,5%	89,0%	89,5%	89,5%	87,6%	89,5%	90,0%	89,5%	93,3%	92,8%	91,4%	99,0%	ID

VP6 - Identidade de aminoácidos

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
AUS/CK00002/2004/G1P[8]	1	ID	97,1%	98,5%	98,5%	98,5%	98,5%	98,5%	98,5%	98,5%	95,7%	95,7%	95,7%	95,7%	97,1%
BRA/df11075/2005/G1P[8]	2	97,1%	ID	98,5%	98,5%	98,5%	98,5%	98,5%	98,5%	98,5%	95,7%	95,7%	95,7%	95,7%	97,1%
BRA/ma18999/2010/G1P[8]	3	98,5%	98,5%	ID	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	97,1%	97,1%	97,1%	97,1%	98,5%
BRA/rs12793/2006/G1P[8]	4	98,5%	98,5%	100,0%	ID	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	97,1%	97,1%	97,1%	97,1%	98,5%
BGD/Bang-063/2008/G1P[8]	5	98,5%	98,5%	100,0%	100,0%	ID	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	97,1%	97,1%	97,1%	97,1%	98,5%
MLI/Mali-133/2008/G1P[8]	6	98,5%	98,5%	100,0%	100,0%	100,0%	ID	100,0%	100,0%	100,0%	97,1%	97,1%	97,1%	97,1%	98,5%
BRA/es15221/2008/G1P[8]	7	98,5%	98,5%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	ID	100,0%	100,0%	97,1%	97,1%	97,1%	97,1%	98,5%
33610/2014/G12P[8]	8	98,5%	98,5%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	ID	100,0%	97,1%	97,1%	97,1%	97,1%	98,5%
3088/2006/G1P[8]	9	98,5%	98,5%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	ID	97,1%	97,1%	97,1%	97,1%	98,5%
3003/2005/G1P[8]	10	95,7%	95,7%	97,1%	97,1%	97,1%	97,1%	97,1%	97,1%	97,1%	ID	100,0%	100,0%	100,0%	98,5%
BEL/BE00056/1999/G1P[8]	11	95,7%	95,7%	97,1%	97,1%	97,1%	97,1%	97,1%	97,1%	97,1%	100,0%	ID	100,0%	100,0%	98,5%
USA/Wa/1974/G1P[8]	12	95,7%	95,7%	97,1%	97,1%	97,1%	97,1%	97,1%	97,1%	97,1%	100,0%	100,0%	ID	100,0%	98,5%
USA/Rotarix/2009/G1P[8]	13	95,7%	95,7%	97,1%	97,1%	97,1%	97,1%	97,1%	97,1%	97,1%	100,0%	100,0%	100,0%	ID	98,5%
BRA/go32872/1987/G1P[8]	14	97,1%	97,1%	98,5%	98,5%	98,5%	98,5%	98,5%	98,5%	98,5%	98,5%	98,5%	98,5%	98,5%	ID

VP7 - Identidade de nucleotídeos

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
USA/Wa/2009/G1P[8]	1	ID	97,9%	92,6%	92,8%	92,9%	92,8%	92,3%	91,5%	91,8%	91,3%	91,6%	91,6%	91,9%	71,2%
BRA/go32872/1987/G1P[8]	2	97,9%	ID	92,0%	92,3%	92,4%	92,3%	91,6%	90,9%	91,1%	90,9%	91,3%	91,3%	91,8%	70,6%
3003/2005/G1P[8]	3	92,6%	92,0%	ID	98,8%	97,6%	96,7%	93,7%	93,3%	93,2%	92,4%	93,3%	93,3%	95,0%	71,0%
BEL/BE00056/1999/G1P[8]	4	92,8%	92,3%	98,8%	ID	98,3%	97,4%	94,1%	93,5%	93,6%	92,8%	93,7%	93,7%	95,7%	71,4%
USA/Rotarix/1988/G1P[8]	5	92,9%	92,4%	97,6%	98,3%	ID	97,6%	94,6%	94,0%	94,1%	93,6%	94,2%	94,1%	95,8%	71,2%
BRA/df11075/2005/G1P[8]	6	92,8%	92,3%	96,7%	97,4%	97,6%	ID	94,9%	94,2%	94,4%	93,6%	94,2%	93,9%	96,1%	70,9%
AUS/CK00002/2004/G1P[8]	7	92,3%	91,6%	93,7%	94,1%	94,6%	94,9%	ID	99,2%	99,4%	98,7%	99,0%	97,4%	96,2%	71,7%
MLI/Mali-133/2008/G1P[8]	8	91,5%	90,9%	93,3%	93,5%	94,0%	94,2%	99,2%	ID	98,9%	98,1%	98,3%	96,8%	95,4%	71,0%
BGD/Bang-063/2008/G1P[8]	9	91,8%	91,1%	93,2%	93,6%	94,1%	94,4%	99,4%	98,9%	ID	98,7%	98,8%	97,1%	95,7%	71,7%
BRA/ma18999/2010/G1P[8]	10	91,3%	90,9%	92,4%	92,8%	93,6%	93,6%	98,7%	98,1%	98,7%	ID	98,0%	96,6%	95,2%	71,7%
3088/2006/G1P[8]	11	91,6%	91,3%	93,3%	93,7%	94,2%	94,2%	99,0%	98,3%	98,8%	98,0%	ID	96,7%	95,5%	71,2%
BRA/es15221/2008/G1P[8]	12	91,6%	91,3%	93,3%	93,7%	94,1%	93,9%	97,4%	96,8%	97,1%	96,6%	96,7%	ID	97,7%	71,0%
BRA/rs12793/2006/G1P[8]	13	91,9%	91,8%	95,0%	95,7%	95,8%	96,1%	96,2%	95,4%	95,7%	95,2%	95,5%	97,7%	ID	71,4%
33610/2014/G12P[8]	14	71,2%	70,6%	71,0%	71,4%	71,2%	70,9%	71,7%	71,0%	71,7%	71,7%	71,2%	71,0%	71,4%	ID

VP7 - Identidade de aminoácidos

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
USA/Wa/2009/G1P[8]	1	ID	98,8%	94,1%	94,5%	95,3%	95,3%	93,7%	95,3%	94,1%	94,9%	94,5%	94,5%	95,3%	73,9%
BRA/go32872/1987/G1P[8]	2	98,8%	ID	93,7%	94,1%	94,9%	94,9%	94,1%	94,9%	93,7%	94,5%	94,1%	94,1%	94,9%	74,3%
3003/2005/G1P[8]	3	94,1%	93,7%	ID	99,6%	97,6%	97,6%	96,4%	94,1%	92,9%	93,7%	93,3%	93,3%	94,5%	72,7%
BEL/BE00056/1999/G1P[8]	4	94,5%	94,1%	99,6%	ID	98,0%	98,0%	96,8%	94,5%	93,3%	94,1%	93,7%	93,7%	94,9%	73,1%
BRA/df11075/2005/G1P[8]	5	95,3%	94,9%	97,6%	98,0%	ID	98,0%	97,2%	94,9%	93,7%	94,5%	94,1%	94,1%	94,5%	73,9%
USA/Rotarix/1988/G1P[8]	6	95,3%	94,9%	97,6%	98,0%	98,0%	ID	96,4%	95,3%	94,1%	94,9%	94,5%	94,5%	95,3%	72,3%
BRA/rs12793/2006/G1P[8]	7	93,7%	94,1%	96,4%	96,8%	97,2%	96,4%	ID	96,1%	94,9%	95,7%	95,3%	95,3%	97,2%	73,5%
AUS/CK00002/2004/G1P[8]	8	95,3%	94,9%	94,1%	94,5%	94,9%	95,3%	96,1%	ID	98,8%	99,6%	99,2%	99,2%	98,0%	73,1%
3088/2006/G1P[8]	9	94,1%	93,7%	92,9%	93,3%	93,7%	94,1%	94,9%	98,8%	ID	98,4%	98,0%	98,0%	96,8%	72,3%
BGD/Bang-063/2008/G1P[8]	10	94,9%	94,5%	93,7%	94,1%	94,5%	94,9%	95,7%	99,6%	98,4%	ID	98,8%	98,8%	97,6%	73,1%
MLI/Mali-133/2008/G1P[8]	11	94,5%	94,1%	93,3%	93,7%	94,1%	94,5%	95,3%	99,2%	98,0%	98,8%	ID	98,8%	97,2%	73,1%
BRA/ma18999/2010/G1P[8]	12	94,5%	94,1%	93,3%	93,7%	94,1%	94,5%	95,3%	99,2%	98,0%	98,8%	98,8%	ID	97,2%	72,7%
BRA/es15221/2008/G1P[8]	13	95,3%	94,9%	94,5%	94,9%	94,5%	95,3%	97,2%	98,0%	96,8%	97,6%	97,2%	97,2%	ID	72,3%
33610/2014/G12P[8]	14	73,9%	74,3%	72,7%	73,1%	73,9%	72,3%	73,5%	73,1%	72,3%	73,1%	73,1%	72,7%	72,3%	ID

NSP1 - Identidade de nucleotídeos

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
MLI/Mali-133/2008/G1P[8]	1	ID	97,3%	98,9%	98,3%	97,8%	98,3%	96,7%	95,1%	83,9%	86,0%	86,6%	86,6%	86,0%	89,8%
3003/2005/G1P[8]	2	97,3%	ID	97,3%	96,7%	96,2%	96,7%	95,1%	93,5%	82,3%	84,4%	85,0%	86,0%	85,5%	88,2%
3088/2006/G1P[8]	3	98,9%	97,3%	ID	98,3%	97,8%	98,3%	96,7%	95,1%	85,0%	87,1%	87,7%	87,7%	87,1%	89,8%
AUS/CK00002/2004/G1P[8]	4	98,3%	96,7%	98,3%	ID	99,4%	97,8%	96,2%	94,6%	83,4%	85,5%	86,0%	86,0%	85,5%	89,3%
BGD/Bang-063/2008/G1P[8]	5	97,8%	96,2%	97,8%	99,4%	ID	97,3%	95,7%	94,1%	83,9%	86,0%	86,6%	86,6%	86,0%	89,8%
33610/2014/G12P[8]	6	98,3%	96,7%	98,3%	97,8%	97,3%	ID	98,3%	95,7%	84,4%	86,6%	87,1%	87,1%	86,6%	90,3%
BRA/ma18999/2010/G1P[8]	7	96,7%	95,1%	96,7%	96,2%	95,7%	98,3%	ID	95,1%	85,0%	87,1%	87,7%	87,7%	87,1%	89,8%
BRA/go32872/1987/G1P[8]	8	95,1%	93,5%	95,1%	94,6%	94,1%	95,7%	95,1%	ID	85,0%	86,0%	86,6%	87,7%	87,1%	90,9%
BRA/df11075/2005/G1P[8]	9	83,9%	82,3%	85,0%	83,4%	83,9%	84,4%	85,0%	85,0%	ID	96,7%	96,2%	95,1%	94,6%	91,9%
USA/Rotarix/2009/G1P[8]	10	86,0%	84,4%	87,1%	85,5%	86,0%	86,6%	87,1%	86,0%	96,7%	ID	98,3%	95,1%	94,6%	94,1%
BEL/BE00056/1999/G1P[8]	11	86,6%	85,0%	87,7%	86,0%	86,6%	87,1%	87,7%	86,6%	96,2%	98,3%	ID	95,7%	95,1%	93,5%
BRA/rs12793/2006/G1P[8]	12	86,6%	86,0%	87,7%	86,0%	86,6%	87,1%	87,7%	87,7%	95,1%	95,1%	95,7%	ID	99,4%	93,5%
BRA/es15221/2008/G1P[8]	13	86,0%	85,5%	87,1%	85,5%	86,0%	86,6%	87,1%	87,1%	94,6%	94,6%	95,1%	99,4%	ID	93,0%
USA/Wa/1974/G1P[8]	14	89,8%	88,2%	89,8%	89,3%	89,8%	90,3%	89,8%	90,9%	91,9%	94,1%	93,5%	93,5%	93,0%	ID

NSP1 - Identidade de aminoácidos

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
AUS/CK00002/2004/G1P[8]	1	ID	100,0%	98,3%	98,3%	96,7%	96,7%	91,9%	96,7%	95,1%	88,7%	90,3%	90,3%	88,7%	88,7%
BGD/Bang-063/2008/G1P[8]	2	100,0%	ID	98,3%	98,3%	96,7%	96,7%	91,9%	96,7%	95,1%	88,7%	90,3%	90,3%	88,7%	88,7%
USA/Wa/1974/G1P[8]	3	98,3%	98,3%	ID	100,0%	98,3%	98,3%	93,5%	98,3%	96,7%	90,3%	91,9%	91,9%	90,3%	90,3%
33610/2014/G12P[8]	4	98,3%	98,3%	100,0%	ID	98,3%	98,3%	93,5%	98,3%	96,7%	90,3%	91,9%	91,9%	90,3%	90,3%
MLI/Mali-133/2008/G1P[8]	5	96,7%	96,7%	98,3%	98,3%	ID	96,7%	91,9%	96,7%	95,1%	88,7%	90,3%	90,3%	88,7%	88,7%
BRA/go32872/1987/G1P[8]	6	96,7%	96,7%	98,3%	98,3%	96,7%	ID	91,9%	96,7%	95,1%	88,7%	90,3%	90,3%	88,7%	88,7%
3003/2005/G1P[8]	7	91,9%	91,9%	93,5%	93,5%	91,9%	91,9%	ID	91,9%	90,3%	85,4%	87,0%	87,0%	88,7%	88,7%
3088/2006/G1P[8]	8	96,7%	96,7%	98,3%	98,3%	96,7%	96,7%	91,9%	ID	96,7%	91,9%	93,5%	93,5%	91,9%	91,9%
BRA/ma18999/2010/G1P[8]	9	95,1%	95,1%	96,7%	96,7%	95,1%	95,1%	90,3%	96,7%	ID	91,9%	93,5%	93,5%	91,9%	91,9%
BRA/df11075/2005/G1P[8]	10	88,7%	88,7%	90,3%	90,3%	88,7%	88,7%	85,4%	91,9%	91,9%	ID	98,3%	95,1%	93,5%	93,5%
USA/Rotarix/2009/G1P[8]	11	90,3%	90,3%	91,9%	91,9%	90,3%	90,3%	87,0%	93,5%	93,5%	98,3%	ID	96,7%	95,1%	95,1%
BEL/BE00056/1999/G1P[8]	12	90,3%	90,3%	91,9%	91,9%	90,3%	90,3%	87,0%	93,5%	93,5%	95,1%	96,7%	ID	95,1%	95,1%
BRA/rs12793/2006/G1P[8]	13	88,7%	88,7%	90,3%	90,3%	88,7%	88,7%	88,7%	91,9%	91,9%	93,5%	95,1%	95,1%	ID	100,0%
BRA/es15221/2008/G1P[8]	14	88,7%	88,7%	90,3%	90,3%	88,7%	88,7%	88,7%	91,9%	91,9%	93,5%	95,1%	95,1%	100,0%	ID

NSP2 - Identidade de nucleotídeos

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
3003/2005/G1P[8]	1	ID	99,1%	98,5%	92,9%	91,7%	92,0%	92,3%	92,9%	92,3%	92,3%	92,0%	89,4%	90,3%	86,8%
BEL/BE00056/1999/G1P[8]	2	99,1%	ID	98,8%	93,2%	92,0%	92,3%	92,6%	93,2%	92,6%	92,6%	92,3%	89,7%	90,6%	87,6%
BRA/df11075/2005/G1P[8]	3	98,5%	98,8%	ID	93,8%	92,6%	92,9%	93,2%	93,8%	93,2%	93,2%	92,9%	90,0%	90,6%	86,8%
AUS/CK00002/2004/G1P[8]	4	92,9%	93,2%	93,8%	ID	98,8%	99,1%	98,8%	99,4%	98,8%	98,8%	97,9%	91,2%	90,3%	85,9%
BRA/ma18999/2010/G1P[8]	5	91,7%	92,0%	92,6%	98,8%	ID	97,9%	97,6%	98,2%	97,6%	97,6%	96,7%	90,0%	89,1%	84,7%
3088/2006/G1P[8]	6	92,0%	92,3%	92,9%	99,1%	97,9%	ID	97,9%	98,5%	97,9%	97,9%	97,0%	90,9%	89,4%	85,6%
MLI/Mali-133/2008/G1P[8]	7	92,3%	92,6%	93,2%	98,8%	97,6%	97,9%	ID	98,2%	97,6%	97,6%	96,7%	90,6%	89,7%	85,3%
BGD/Bang-063/2008/G1P[8]	8	92,9%	93,2%	93,8%	99,4%	98,2%	98,5%	98,2%	ID	98,8%	98,8%	97,9%	91,4%	90,3%	85,3%
BRA/rs12793/2006/G1P[8]	9	92,3%	92,6%	93,2%	98,8%	97,6%	97,9%	97,6%	98,8%	ID	100,0%	97,9%	91,2%	90,9%	85,3%
BRA/es15221/2008/G1P[8]	10	92,3%	92,6%	93,2%	98,8%	97,6%	97,9%	97,6%	98,8%	100,0%	ID	97,9%	91,2%	90,9%	85,3%
33610/2014/G12P[8]	11	92,0%	92,3%	92,9%	97,9%	96,7%	97,0%	96,7%	97,9%	97,9%	97,9%	ID	90,3%	90,0%	85,0%
USA/Wa/1974/G1P[8]	12	89,4%	89,7%	90,0%	91,2%	90,0%	90,9%	90,6%	91,4%	91,2%	91,2%	90,3%	ID	91,2%	86,5%
USA/Rotarix/2009/G1P[8]	13	90,3%	90,6%	90,6%	90,3%	89,1%	89,4%	89,7%	90,3%	90,9%	90,9%	90,0%	91,2%	ID	87,6%
KM026609-RVA/31-371	14	86,8%	87,6%	86,8%	85,9%	84,7%	85,6%	85,3%	85,3%	85,3%	85,3%	85,0%	86,5%	87,6%	ID

NSP2 - Identidade de aminoácidos

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
3003/2005/G1P[8]	1	ID	100,0%	99,1%	93,8%	94,7%	94,7%	92,9%	94,7%	94,7%	94,7%	92,9%	93,8%	93,8%	92,9%
BEL/BE00056/1999/G1P[8]	2	100,0%	ID	99,1%	93,8%	94,7%	94,7%	92,9%	94,7%	94,7%	94,7%	92,9%	93,8%	93,8%	92,9%
BRA/df11075/2005/G1P[8]	3	99,1%	99,1%	ID	94,7%	95,6%	95,6%	93,8%	95,6%	95,6%	95,6%	93,8%	92,9%	92,9%	92,1%
BGD/Bang-063/2008/G1P[8]	4	93,8%	93,8%	94,7%	ID	99,1%	99,1%	97,3%	99,1%	99,1%	99,1%	97,3%	94,7%	94,7%	90,3%
33610/2014/G12P[8]	5	94,7%	94,7%	95,6%	99,1%	ID	100,0%	98,2%	100,0%	100,0%	100,0%	98,2%	95,6%	95,6%	91,2%
MLI/Mali-133/2008/G1P[8]	6	94,7%	94,7%	95,6%	99,1%	100,0%	ID	98,2%	100,0%	100,0%	100,0%	98,2%	95,6%	95,6%	91,2%
BRA/ma18999/2010/G1P[8]	7	92,9%	92,9%	93,8%	97,3%	98,2%	98,2%	ID	98,2%	98,2%	98,2%	96,4%	93,8%	93,8%	89,4%
AUS/CK00002/2004/G1P[8]	8	94,7%	94,7%	95,6%	99,1%	100,0%	100,0%	98,2%	ID	100,0%	100,0%	98,2%	95,6%	95,6%	91,2%
BRA/rs12793/2006/G1P[8]	9	94,7%	94,7%	95,6%	99,1%	100,0%	100,0%	98,2%	100,0%	ID	100,0%	98,2%	95,6%	95,6%	91,2%
BRA/es15221/2008/G1P[8]	10	94,7%	94,7%	95,6%	99,1%	100,0%	100,0%	98,2%	100,0%	100,0%	ID	98,2%	95,6%	95,6%	91,2%
3088/2006/G1P[8]	11	92,9%	92,9%	93,8%	97,3%	98,2%	98,2%	96,4%	98,2%	98,2%	98,2%	ID	93,8%	93,8%	89,4%
USA/Wa/1974/G1P[8]	12	93,8%	93,8%	92,9%	94,7%	95,6%	95,6%	93,8%	95,6%	95,6%	95,6%	93,8%	ID	94,7%	92,1%
USA/Rotarix/2009/G1P[8]	13	93,8%	93,8%	92,9%	94,7%	95,6%	95,6%	93,8%	95,6%	95,6%	95,6%	93,8%	94,7%	ID	92,9%
BRA/go32872/1987/G1P[8]	14	92,9%	92,9%	92,1%	90,3%	91,2%	91,2%	89,4%	91,2%	91,2%	91,2%	89,4%	92,1%	92,9%	ID

NSP3 - Identidade de nucleotídeos

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
AUS/CK00002/2004/G1P[8]	1	ID	99,5%	99,3%	99,3%	97,9%	96,0%	95,6%	96,0%	96,3%	92,6%	96,3%	96,7%	96,9%	83,1%
3088/2006/G1P[8]	2	99,5%	ID	98,9%	98,9%	97,5%	95,6%	95,2%	95,6%	95,8%	92,1%	95,8%	96,3%	96,5%	83,1%
BGD/Bang-063/2008/G1P[8]	3	99,3%	98,9%	ID	99,1%	97,7%	95,4%	95,0%	95,8%	96,0%	92,4%	96,0%	96,5%	96,7%	83,3%
BRA/ma18999/2010/G1P[8]	4	99,3%	98,9%	99,1%	ID	98,5%	96,3%	95,8%	96,7%	96,9%	93,2%	96,9%	97,3%	97,5%	83,7%
33610/2014/G12P[8]	5	97,9%	97,5%	97,7%	98,5%	ID	94,8%	94,4%	95,2%	95,4%	91,9%	95,4%	95,8%	96,0%	83,1%
USA/Wa/1974/G1P[8]	6	96,0%	95,6%	95,4%	96,3%	94,8%	ID	99,1%	98,7%	98,5%	94,8%	97,7%	97,7%	97,1%	83,5%
BRA/go32872/1987/G1P[8]	7	95,6%	95,2%	95,0%	95,8%	94,4%	99,1%	ID	97,9%	98,1%	94,4%	97,3%	97,3%	96,7%	83,1%
BEL/BE00056/1999/G1P[8]	8	96,0%	95,6%	95,8%	96,7%	95,2%	98,7%	97,9%	ID	98,9%	94,8%	98,1%	98,1%	97,5%	84,1%
USA/Rotarix/2009/G1P[8]	9	96,3%	95,8%	96,0%	96,9%	95,4%	98,5%	98,1%	98,9%	ID	95,2%	98,3%	98,3%	97,7%	83,9%
3003/2005/G1P[8]	10	92,6%	92,1%	92,4%	93,2%	91,9%	94,8%	94,4%	94,8%	95,2%	ID	95,0%	94,2%	93,6%	81,7%
BRA/df11075/2005/G1P[8]	11	96,3%	95,8%	96,0%	96,9%	95,4%	97,7%	97,3%	98,1%	98,3%	95,0%	ID	97,9%	97,3%	84,3%
BRA/rs12793/2006/G1P[8]	12	96,7%	96,3%	96,5%	97,3%	95,8%	97,7%	97,3%	98,1%	98,3%	94,2%	97,9%	ID	99,3%	84,5%
BRA/es15221/2008/G1P[8]	13	96,9%	96,5%	96,7%	97,5%	96,0%	97,1%	96,7%	97,5%	97,7%	93,6%	97,3%	99,3%	ID	83,9%
MLI/Mali-133/2008/G1P[8]	14	83,1%	83,1%	83,3%	83,7%	83,1%	83,5%	83,1%	84,1%	83,9%	81,7%	84,3%	84,5%	83,9%	ID

NSP3 - Identidade de aminoácidos

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
3003/2005/G1P[8]	1	ID	94,4%	94,4%	94,4%	94,4%	94,4%	93,8%	92,5%	93,8%	92,5%	92,5%	93,8%	93,8%	83,9%
USA/Rotarix/2009/G1P[8]	2	94,4%	ID	99,3%	99,3%	99,3%	99,3%	98,7%	97,5%	98,7%	97,5%	97,5%	98,7%	98,7%	88,8%
USA/Wa/1974/G1P[8]	3	94,4%	99,3%	ID	100,0%	100,0%	100,0%	99,3%	98,1%	99,3%	98,1%	98,1%	99,3%	99,3%	89,5%
BRA/go32872/1987/G1P[8]	4	94,4%	99,3%	100,0%	ID	100,0%	100,0%	99,3%	98,1%	99,3%	98,1%	98,1%	99,3%	99,3%	89,5%
BRA/df11075/2005/G1P[8]	5	94,4%	99,3%	100,0%	100,0%	ID	100,0%	99,3%	98,1%	99,3%	98,1%	98,1%	99,3%	99,3%	89,5%
BRA/rs12793/2006/G1P[8]	6	94,4%	99,3%	100,0%	100,0%	100,0%	ID	99,3%	98,1%	99,3%	98,1%	98,1%	99,3%	99,3%	89,5%
AUS/CK00002/2004/G1P[8]	7	93,8%	98,7%	99,3%	99,3%	99,3%	99,3%	ID	98,7%	100,0%	98,7%	98,7%	98,7%	98,7%	88,8%
33610/2014/G12P[8]	8	92,5%	97,5%	98,1%	98,1%	98,1%	98,1%	98,7%	ID	98,7%	97,5%	97,5%	97,5%	97,5%	87,6%
BRA/ma18999/2010/G1P[8]	9	93,8%	98,7%	99,3%	99,3%	99,3%	99,3%	100,0%	98,7%	ID	98,7%	98,7%	98,7%	98,7%	88,8%
BGD/Bang-063/2008/G1P[8]	10	92,5%	97,5%	98,1%	98,1%	98,1%	98,1%	98,7%	97,5%	98,7%	ID	97,5%	97,5%	97,5%	88,2%
3088/2006/G1P[8]	11	92,5%	97,5%	98,1%	98,1%	98,1%	98,1%	98,7%	97,5%	98,7%	97,5%	ID	97,5%	97,5%	88,2%
BRA/es15221/2008/G1P[8]	12	93,8%	98,7%	99,3%	99,3%	99,3%	99,3%	98,7%	97,5%	98,7%	97,5%	97,5%	ID	98,7%	89,5%
BEL/BE00056/1999/G1P[8]	13	93,8%	98,7%	99,3%	99,3%	99,3%	99,3%	98,7%	97,5%	98,7%	97,5%	97,5%	98,7%	ID	90,1%
MLI/Mali-133/2008/G1P[8]	14	83,9%	88,8%	89,5%	89,5%	89,5%	89,5%	88,8%	87,6%	88,8%	88,2%	88,2%	89,5%	90,1%	ID

NSP4 - Identidade de nucleotídeos

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
3088/2006/G1P[8]	1	ID	99,4%	99,2%	98,4%	98,4%	98,0%	96,3%	96,5%	92,2%	91,8%	91,1%	90,1%	91,3%	92,4%
BRA/ma18999/2010/G1P[8]	2	99,4%	ID	99,0%	98,2%	98,6%	97,8%	96,5%	96,3%	92,0%	91,6%	91,3%	89,9%	91,1%	92,2%
AUS/CK00002/2004/G1P[8]	3	99,2%	99,0%	ID	98,8%	98,8%	98,4%	96,7%	96,9%	92,6%	92,2%	91,8%	90,5%	91,6%	92,8%
BGD/Bang-063/2008/G1P[8]	4	98,4%	98,2%	98,8%	ID	98,0%	97,6%	96,3%	96,5%	92,6%	92,2%	91,5%	90,5%	91,6%	92,8%
MLI/Mali-133/2008/G1P[8]	5	98,4%	98,6%	98,8%	98,0%	ID	98,0%	97,1%	96,9%	92,4%	92,0%	91,6%	90,3%	91,5%	92,6%
3003/2005/G1P[8]	6	98,0%	97,8%	98,4%	97,6%	98,0%	ID	96,3%	96,9%	92,6%	92,2%	91,6%	90,7%	91,6%	93,2%
33610/2014/G12P[8]	7	96,3%	96,5%	96,7%	96,3%	97,1%	96,3%	ID	95,9%	91,5%	91,1%	90,5%	89,7%	91,1%	91,6%
BRA/es15221/2008/G1P[8]	8	96,5%	96,3%	96,9%	96,5%	96,9%	96,9%	95,9%	ID	93,0%	92,6%	91,8%	91,3%	92,0%	93,2%
USA/Wa/1974/G1P[8]	9	92,2%	92,0%	92,6%	92,6%	92,4%	92,6%	91,5%	93,0%	ID	98,4%	97,2%	96,3%	96,3%	98,2%
USA/Rotarix/2009/G1P[8]	10	91,8%	91,6%	92,2%	92,2%	92,0%	92,2%	91,1%	92,6%	98,4%	ID	96,9%	95,9%	95,5%	97,4%
BRA/go32872/1987/G1P[8]	11	91,1%	91,3%	91,8%	91,5%	91,6%	91,6%	90,5%	91,8%	97,2%	96,9%	ID	95,3%	95,1%	96,7%
BRA/df11075/2005/G1P[8]	12	90,1%	89,9%	90,5%	90,5%	90,3%	90,7%	89,7%	91,3%	96,3%	95,9%	95,3%	ID	96,9%	95,7%
BRA/rs12793/2006/G1P[8]	13	91,3%	91,1%	91,6%	91,6%	91,5%	91,6%	91,1%	92,0%	96,3%	95,5%	95,1%	96,9%	ID	96,1%
BEL/BE00056/1999/G1P[8]	14	92,4%	92,2%	92,8%	92,8%	92,6%	93,2%	91,6%	93,2%	98,2%	97,4%	96,7%	95,7%	96,1%	ID

NSP4 - Identidade de aminoácidos

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
USA/Wa/1974/G1P[8]	1	ID	97,6%	98,8%	95,9%	95,9%	95,9%	96,4%	95,9%	95,9%	95,3%	96,4%	96,4%	95,3%	95,3%
USA/Rotarix/2009/G1P[8]	2	97,6%	ID	98,2%	95,3%	95,3%	95,3%	95,9%	95,3%	95,3%	94,7%	95,9%	95,9%	95,9%	94,7%
BEL/BE00056/1999/G1P[8]	3	98,8%	98,2%	ID	97,0%	97,0%	97,0%	97,6%	97,0%	97,0%	96,4%	97,6%	97,6%	96,4%	96,4%
3088/2006/G1P[8]	4	95,9%	95,3%	97,0%	ID	100,0%	98,8%	99,4%	98,8%	97,6%	96,4%	98,2%	95,3%	93,5%	93,5%
BRA/ma18999/2010/G1P[8]	5	95,9%	95,3%	97,0%	100,0%	ID	98,8%	99,4%	98,8%	97,6%	96,4%	98,2%	95,3%	93,5%	93,5%
3003/2005/G1P[8]	6	95,9%	95,3%	97,0%	98,8%	98,8%	ID	99,4%	98,8%	97,6%	96,4%	98,2%	95,3%	93,5%	93,5%
AUS/CK00002/2004/G1P[8]	7	96,4%	95,9%	97,6%	99,4%	99,4%	99,4%	ID	99,4%	98,2%	97,0%	98,8%	95,9%	94,1%	94,1%
MLI/Mali-133/2008/G1P[8]	8	95,9%	95,3%	97,0%	98,8%	98,8%	98,8%	99,4%	ID	98,8%	97,6%	98,2%	95,3%	93,5%	93,5%
33610/2014/G12P[8]	9	95,9%	95,3%	97,0%	97,6%	97,6%	97,6%	98,2%	98,8%	ID	97,6%	98,2%	95,3%	93,5%	93,5%
BRA/es15221/2008/G1P[8]	10	95,3%	94,7%	96,4%	96,4%	96,4%	96,4%	97,0%	97,6%	97,6%	ID	97,0%	94,7%	92,9%	92,9%
BGD/Bang-063/2008/G1P[8]	11	96,4%	95,9%	97,6%	98,2%	98,2%	98,2%	98,8%	98,2%	98,2%	97,0%	ID	95,9%	94,1%	94,1%
BRA/go32872/1987/G1P[8]	12	96,4%	95,9%	97,6%	95,3%	95,3%	95,3%	95,9%	95,3%	95,3%	94,7%	95,9%	ID	95,3%	95,3%
BRA/df11075/2005/G1P[8]	13	95,3%	95,9%	96,4%	93,5%	93,5%	93,5%	94,1%	93,5%	93,5%	92,9%	94,1%	95,3%	ID	95,3%
BRA/rs12793/2006/G1P[8]	14	95,3%	94,7%	96,4%	93,5%	93,5%	93,5%	94,1%	93,5%	93,5%	92,9%	94,1%	95,3%	95,3%	ID

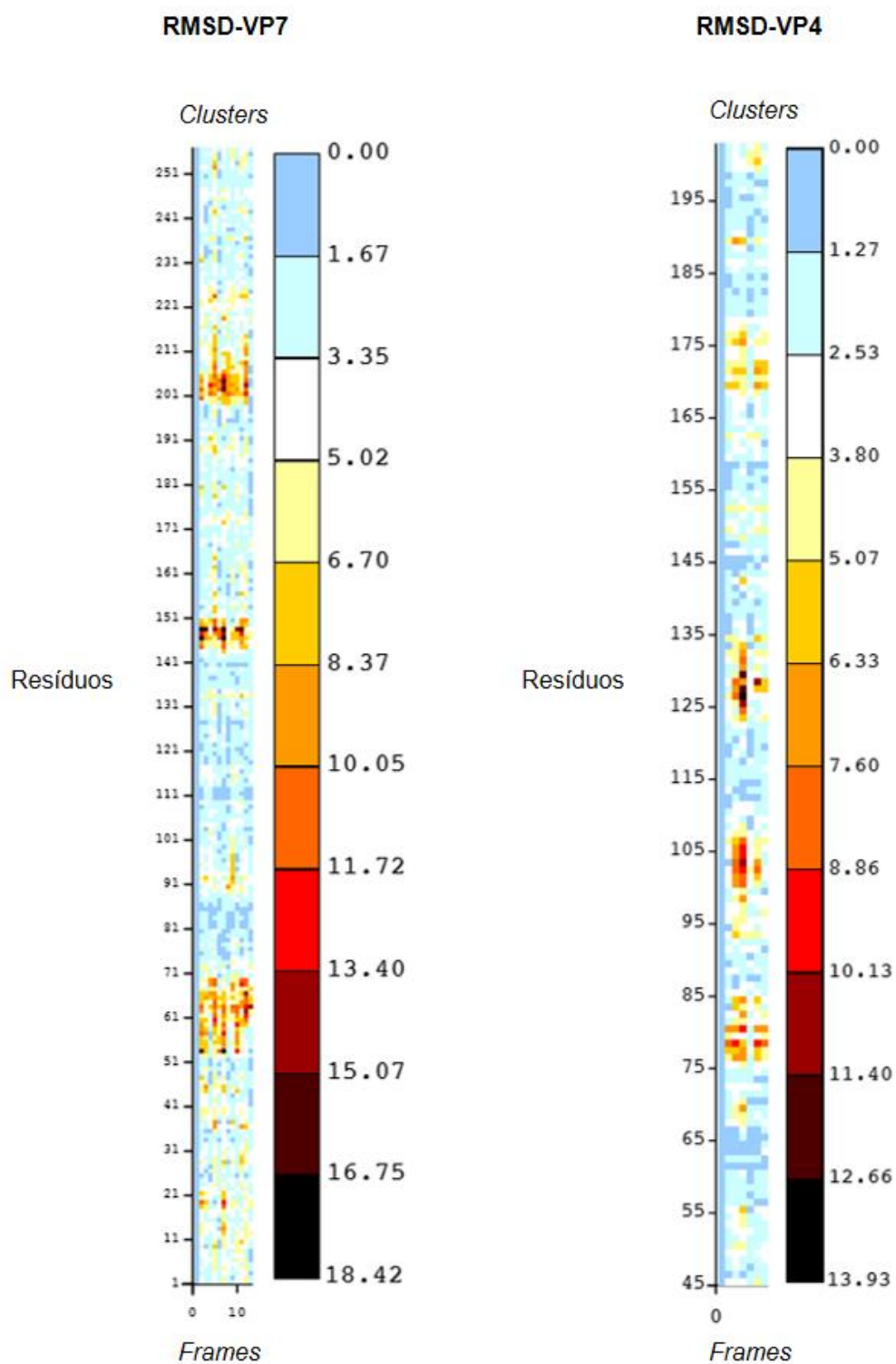
NSP5/6 - Identidade de nucleotídeos

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
USA/Wa/1974/G1P[8]	1	ID	99,0%	98,8%	99,0%	97,6%	97,8%	96,1%	92,8%	92,6%	93,0%	93,6%	93,4%	94,1%	93,9%
BRA/df11075/2005/G1P[8]	2	99,0%	ID	98,6%	98,8%	97,4%	97,6%	96,5%	93,0%	92,8%	93,4%	93,7%	93,6%	94,3%	94,1%
BEL/BE00056/1999/G1P[8]	3	98,8%	98,6%	ID	98,6%	97,2%	97,8%	96,1%	92,8%	92,6%	93,0%	93,6%	93,4%	94,1%	93,9%
USA/Rotarix/2009/G1P[8]	4	99,0%	98,8%	98,6%	ID	97,8%	97,6%	95,9%	92,6%	92,4%	92,8%	93,7%	93,2%	93,9%	93,7%
BRA/go32872/1987/G1P[8]	5	97,6%	97,4%	97,2%	97,8%	ID	96,3%	95,7%	93,2%	93,0%	93,0%	94,3%	93,0%	93,7%	93,9%
3003/2005/G1P[8]	6	97,8%	97,6%	97,8%	97,6%	96,3%	ID	96,3%	93,0%	92,8%	93,2%	93,4%	93,9%	94,3%	94,1%
BRA/rs12793/2006/G1P[8]	7	96,1%	96,5%	96,1%	95,9%	95,7%	96,3%	ID	95,9%	95,7%	96,8%	96,7%	96,1%	96,5%	96,7%
3088/2006/G1P[8]	8	92,8%	93,0%	92,8%	92,6%	93,2%	93,0%	95,9%	ID	99,8%	97,8%	98,0%	96,7%	97,4%	97,6%
AUS/CK00002/2004/G1P[8]	9	92,6%	92,8%	92,6%	92,4%	93,0%	92,8%	95,7%	99,8%	ID	97,6%	97,8%	96,5%	97,2%	97,4%
BRA/es15221/2008/G1P[8]	10	93,0%	93,4%	93,0%	92,8%	93,0%	93,2%	96,8%	97,8%	97,6%	ID	98,2%	97,2%	97,6%	97,8%
MLI/Mali-133/2008/G1P[8]	11	93,6%	93,7%	93,6%	93,7%	94,3%	93,4%	96,7%	98,0%	97,8%	98,2%	ID	97,4%	98,2%	98,4%
33610/2014/G12P[8]	12	93,4%	93,6%	93,4%	93,2%	93,0%	93,9%	96,1%	96,7%	96,5%	97,2%	97,4%	ID	99,2%	99,0%
BRA/ma18999/2010/G1P[8]	13	94,1%	94,3%	94,1%	93,9%	93,7%	94,3%	96,5%	97,4%	97,2%	97,6%	98,2%	99,2%	ID	99,8%
BGD/Bang-063/2008/G1P[8]	14	93,9%	94,1%	93,9%	93,7%	93,9%	94,1%	96,7%	97,6%	97,4%	97,8%	98,4%	99,0%	99,8%	ID

NSP5/6 - Identidade de aminoácidos

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
3088/2006/G1P[8]	1	ID	99,4%	97,0%	98,8%	98,8%	98,2%	98,2%	95,9%	92,9%	93,5%	93,5%	92,9%	93,5%	93,5%
AUS/CK00002/2004/G1P[8]	2	99,4%	ID	96,4%	98,2%	98,2%	97,6%	97,6%	95,3%	92,3%	92,9%	92,9%	92,3%	92,9%	92,9%
33610/2014/G12P[8]	3	97,0%	96,4%	ID	98,2%	98,2%	97,6%	97,6%	95,3%	92,3%	92,9%	92,9%	92,3%	92,9%	92,9%
BRA/ma18999/2010/G1P[8]	4	98,8%	98,2%	98,2%	ID	100,0%	99,4%	99,4%	97,0%	94,1%	94,7%	94,7%	94,1%	94,7%	94,7%
BGD/Bang-063/2008/G1P[8]	5	98,8%	98,2%	98,2%	100,0%	ID	99,4%	99,4%	97,0%	94,1%	94,7%	94,7%	94,1%	94,7%	94,7%
MLI/Mali-133/2008/G1P[8]	6	98,2%	97,6%	97,6%	99,4%	99,4%	ID	98,8%	96,4%	93,5%	94,1%	94,1%	93,5%	95,3%	95,3%
BRA/es15221/2008/G1P[8]	7	98,2%	97,6%	97,6%	99,4%	99,4%	98,8%	ID	97,6%	93,5%	94,1%	94,1%	93,5%	94,1%	94,1%
BRA/rs12793/2006/G1P[8]	8	95,9%	95,3%	95,3%	97,0%	97,0%	96,4%	97,6%	ID	95,9%	96,4%	96,4%	95,9%	96,4%	96,4%
BEL/BE00056/1999/G1P[8]	9	92,9%	92,3%	92,3%	94,1%	94,1%	93,5%	93,5%	95,9%	ID	98,2%	98,2%	97,6%	98,2%	98,2%
BRA/df11075/2005/G1P[8]	10	93,5%	92,9%	92,9%	94,7%	94,7%	94,1%	94,1%	96,4%	98,2%	ID	98,8%	98,2%	98,8%	98,8%
3003/2005/G1P[8]	11	93,5%	92,9%	92,9%	94,7%	94,7%	94,1%	94,1%	96,4%	98,2%	98,8%	ID	98,2%	98,8%	98,8%
USA/Wa/1974/G1P[8]	12	92,9%	92,3%	92,3%	94,1%	94,1%	93,5%	93,5%	95,9%	97,6%	98,2%	98,2%	ID	98,2%	98,2%
BRA/go32872/1987/G1P[8]	13	93,5%	92,9%	92,9%	94,7%	94,7%	95,3%	94,1%	96,4%	98,2%	98,8%	98,8%	98,2%	ID	100,0%
USA/Rotarix/2009/G1P[8]	14	93,5%	92,9%	92,9%	94,7%	94,7%	95,3%	94,1%	96,4%	98,2%	98,8%	98,8%	98,2%	100,0%	ID

Apêndice VI. Valores de *Root Mean Square Deviation* (RMSD).



ANEXOS

Anexo I. Artigo 1



doi: 10.5216/rpt.v46i1.46300

SHORT REPORT

CIRCULATING PROFILE OF ROTAVIRUS A, G AND P GENOTYPES BEFORE AND AFTER VACCINE INTRODUCTION IN THE BRAZILIAN MID-WEST 1986-2015

Tâmera Nunes Vieira Almeida, Teresinha Teixeira de Sousa, Menira Souza, Fabíola Souza Fiaccadori, Kareem Rady Badr and Divina das Dôres de Paula Cardoso

ABSTRACT

The purpose of this study was to perform a comparative analysis of Rotavirus A (RVA) G and P genotypes circulating in the Brazilian Mid-West in the period 1986-2015. Seven studies conducted from 1986 to 2009 were included, as well as fecal samples obtained in the period 2014-2015. RVA was screened by ELISA and/or PAGE; genotyping by conventional RT-PCR and/or genomic sequencing. A temporal variation in the predominance of G genotypes mainly G1 and G2 with G9 and G12 emergence was observed. Even with vaccination, RVA continues to circulate in the population, requiring continuous virus monitoring.

KEY WORDS: Rotavirus infections; genotype; vaccination.

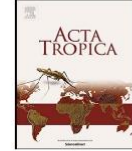
Rotavirus A (RVA) is an important causative agent of acute gastroenteritis (AGE) mainly affecting infants. The viral particle is non-enveloped and formed by three concentric protein layers that surround 11 segments of double-stranded RNA (dsRNA) (Estes & Greenberg, 2013).

Each RVA genomic segment has extensive variability, which may reflect in antigenic diversity of the respective proteins, mainly VP7 and VP4 proteins that comprise the outer layer. RVA has been classified in a binary system represented by the combination of G genotypes (VP7) and P (VP4) genotypes (Estes & Greenberg, 2013). There are, so far, 32G (G1-G32) and 47P (P[1]-P[47]) genotypes described (RCWG, 2016). In humans, the most common combinations are G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8], G9P[8], and G12P[8] (Santos & Hoshino, 2005, Dóro et al., 2014).

Departamento de Microbiologia, Imunologia, Parasitologia e Patologia Geral, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil.

Corresponding author: Dra. Divina das Dôres de Paula Cardoso. Rua 235 s/n, esquina com 1ª Avenida, Setor Universitário, CEP 74605-050 Goiânia, Goiás, Brazil. E-mail: dcardoso@ufg.br

Received for publication: 27/12/2016. Reviewed: 28/3/2017. Accepted: 29/3/2017.



Phylogenetic analysis of G1P[8] and G12P[8] rotavirus A samples obtained in the pre- and post-vaccine periods, and molecular modeling of VP4 and VP7 proteins



Tâmera Nunes Vieira Almeida^a, Teresinha Teixeira de Sousa^a, Roosevelt Alves da Silva^b, Fabíola Souza Fiaccadori^a, Menira Souza^a, Kareem Rady Badr^a, Divina das Dôres de Paula Cardoso^{a,*}

^a Departamento de Microbiologia, Imunologia, Parasitologia e Patologia, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás; rua 235 s/n, esquina com 1ª Avenida, Setor Universitário, CEP 74605-050 Goiânia, Goiás, Brazil

^b Instituto de Física, Universidade Federal de Goiás; BR 364, km 192, n. 3800, Setor Parque Industrial, Jataí, Goiás, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Genotyping
Rotavirus A
Phylogenetic analysis
Molecular modeling

ABSTRACT

Reduction in morbimortality rates for acute gastroenteritis (AGE) by Rotavirus A (RVA) has been observed after the introduction of vaccines, however the agent continues to circulate. The present study described the genomic characterization of the 11 dsRNA segments of two RVA samples G1P[8] obtained in the pre- and post-vaccination periods and one of G12P[8] sample (post-vaccine), compared to Rotarix™ vaccine. Analysis by molecular sequencing of the samples showed that the three samples belonged to genogroup I. In addition, the analysis of VP7 gene revealed that the samples G1 (pre-vaccine), G1 (post-vaccine) and G12 were characterized as lineages II, I and III, respectively. Regarding to VP4 and NSP4 gene it was observed that all samples belonged to lineage III, whereas for VP6 gene, the sample of the pre- and post-vaccine belonged to the lineage IV and I, respectively. Considering the VP7 gene, it was observed high nucleotide and amino acid identity for the two G1 samples when compared to Rotarix™ vaccine and lesser identity for the G12 sample. In relation to antigenic epitope of VP7 greater modifications were observed for the G12 sample in the 7-2 epitope that was confirmed by molecular modeling. On the other hand, for VP4, some changes in the 8-1 and 8-3 antigenic epitopes was observed for the three samples. This data could be interpreted as a low selective pressure exerted by vaccination in relation to G1P[8] samples and lesser protection in relation to G12P[8]. Thus, the continuous monitoring of RVA circulating samples remains important.

1. Introduction

Rotavirus A (RVA), genus *Rotavirus*, family *Reoviridae*, is an important acute gastroenteritis (AGE) agent among children under five years of age, accounting for approximately 215,000 deaths annually worldwide, with the highest rates occurring in developing countries (Tate et al., 2016).

The RVA particle is non-enveloped, has icosahedral symmetry, and consists of three concentric layers of protein designated, outer, intermediate, and inner core capsids. The viral genome is composed of 11 double-stranded RNA (dsRNA) segments encoding six structural (VP1-4, VP6 and VP7) and six non-structural (NSP1-6) proteins. The outer capsid is formed by VP7 protein, encoded by genomic segments 7, 8 or 9 from which VP4 spikes, encoded by segment 4, protrude. The

intermediate capsid, composed by VP6, is encoded by segment 6 and the inner core capsid is formed by VP2 (segment 2) in which are inserted VP1 and VP3, encoded by segments 1 and 3, respectively (Estes and Greenberg, 2013). All genomic segments present high genomic/antigenic variability, resulting in different genotypes that vary in their occurrence over time.

VP7 and VP4 genes suffer extensive variability and G and P genotypes may occur in different combinations. The most frequent in the human population are G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8], G9P[8] and G12P[8] (Dóro et al., 2014; Estes and Greenberg, 2013; Luchs et al., 2016).

This binary classification system has been widely used; however, due to the wide variability of 11 segments of dsRNA a new classification has been proposed (Rotavirus Classification Working Group – RCWG).

* Corresponding author.

E-mail addresses: tameraalmeida@hotmail.com (T.N.V. Almeida), mandassaiats@hotmail.com (T.T. de Sousa), rooseveltfsicaufg@gmail.com (R.A. da Silva), fabiolasf@gmail.com (F.S. Fiaccadori), menirasouza@gmail.com (M. Souza), kareem_nrc@yahoo.com (K.R. Badr), dcardoso@ufg.br (D.d.D. de Paula Cardoso).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.06.009>

Received 10 February 2017; Received in revised form 31 May 2017; Accepted 7 June 2017

Available online 09 June 2017

0001-706X/ © 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.