



**UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA**

ALESSANDRA CRISTINA SOARES DOS SANTOS

**CARACTERIZAÇÃO DE CEPAS DE ROTAVÍRUS HUMANOS
EM CULTURA DE CÉLULAS**

Londrina
2007

ALESSANDRA CRISTINA SOARES DOS SANTOS

**CARACTERIZAÇÃO DE CEPAS DE ROTAVÍRUS HUMANOS
EM CULTURA DE CÉLULAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Carlos Nozawa

Londrina
2007

ALESSANDRA CRISTINA SOARES DOS SANTOS

**CARACTERIZAÇÃO DE CEPAS DE ROTAVÍRUS HUMANOS
EM CULTURA DE CÉLULAS**

BANCA EXAMINADORA

Dr. Laerte Francisco Filippesen

Profa. Jacinta Sanchez Pelayo

Prof. Carlos Nozawa

Londrina, 09 de março de 2007.

DEDICATÓRIA

**Para meus pais José Fernandes e Vânia,
dedico a vocês, que em nenhum
momento deixaram de me apoiar.**

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, José Fernandes e Vânia, pelo suporte e apoio incondicionais.

A Miguel Angelo, pela paciência, atenção e dedicação.

À minha irmã, Alaine Crissiê, pelo carinho demonstrado.

Ao Prof. Carlos Nozawa pela oportunidade.

À Prof^a. Adriana Mary Mestriner F. de Melo por despertar meu interesse.

Ao amigo Fabrício José Benatti pelas orientações, disposição e por contribuir para que a técnica de RT-PCR pudesse estar presente neste trabalho.

Ao amigo Flávio Lauretti pelos ensinamentos e prestimosidade.

À amiga de todas as horas Raquel Girardello pelo incentivo e amizade.

À Prof^a. Rosa Elisa C. Linhares, uma amiga com conselhos e pelo conhecimento transmitido.

À Prof^a. Jacinta Sanches Pelayo pela simplicidade e momentos de descontração.

À Prof^a Sueli Fumie Yamada Ogatta pelo suporte sobre o método de extração de material genético.

Ao Prof. Marco Antonio Nogueira pela primeira lição.

A todos os professores do Programa de Mestrado em Microbiologia pela experiência transmitida.

Aos colegas de Mestrado: Alessandra, Ariane, Érika, Fernando, Leandro, Letícia, Luis, Marcelo Carneiro, Marcelo Tempesta, Mariana e Nádia, pelo companheirismo e discussões, especialmente à Kathelin Lascowski e Paulo Roberto Correa, companheiros de seminários, contribuíram muito para o meu crescimento.

Aos colegas de laboratório: Bárbara, Daniel, Kristie, Lúgia, Mariana e Vinícius pela troca de conhecimento e convivência diária.

A Eduardo Pietruchinski que coletou as amostras com as quais trabalhei.

À Jussevânia Sá e Valdelice dos Santos pelo apoio técnico.

À Profª Célia Guadalupe Tardeli de Jesus Andrade que com competência prestou todo o auxílio na microscopia eletrônica de transmissão.

A José Marques Neto que com simplicidade e amizade disponibilizou seus conhecimentos fotográficos e desta forma, colaborou de forma decisiva para a conclusão deste trabalho.

À Profª Norma Sueli de Oliveira Santos do Laboratório de Virologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro que disponibilizou não apenas seu laboratório para a execução da técnica de RT-PCR, como também, todos os materiais necessários para sua realização.

A todos os pesquisadores e técnicos que contribuíram abrindo as portas de seus laboratórios para que eu tivesse acesso a seus equipamentos.

SANTOS, Alessandra Cristina Soares dos. **Caracterização de cepas de rotavírus humanos em cultura de células**. 2007. 63f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2007.

RESUMO

O rotavírus é um patógeno comum, principal causador de gastroenterite em crianças em todo o mundo, acometendo, principalmente, crianças abaixo de 24 meses de idade. A infecção é responsável por aproximadamente 45% das doenças diarréicas severas em bebês e crianças, tanto em países desenvolvidos quanto em países em desenvolvimento. Este trabalho foi proposto no sentido de isolar/adaptar cepas de rotavírus humano em cultura de células MA-104 (rim fetal de macaco verde africano), a partir de amostras de campo. Para este propósito utilizou-se culturas de células em tubos de vidro, inoculadas com materiais fecais positivos para rotavírus, clarificados e descontaminados. Cinquenta e três extratos fecais clarificados foram inoculados em cultura de células, sendo que os materiais foram submetidos à no mínimo três passagens cegas sucessivas, para permitir a adaptação, antes de considerá-las não adaptáveis. A comprovação do isolamento das cepas foi realizada através de: a) observação do efeito citopático (ECP), b) reação de imunofluorescência indireta (RIF), c) ensaio de plaque (EP) e reação em cadeia da polimerase associada à transcriptase reversa (RT-PCR). Doze amostras processadas apresentaram resultados compatíveis com a adaptação viral em cultura de células, demonstrado através do efeito citopático (ECP) típico de rotavírus, além da apresentação de fluorescência específica granular e de distribuição, predominantemente, perinuclear nas culturas submetidas à RIF. O isolamento viral foi também comprovado através da capacidade das cepas desenvolverem plaques, assim como pela possibilidade das cepas serem amplificadas por RT-PCR. O EP possibilitou ainda a demonstração de plaques com variação de diâmetro.

Palavras-chave: Microbiologia. Rotavírus. Células. Cultura e meios de cultura.

SANTOS, Alessandra Cristina Soares dos. **Caracterização de cepas de rotavírus humanos em cultura de células**. 2007. 63 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2007.

ABSTRACT

Rotaviruses are the single most important cause of severe diarrheal illness in infants and young children in both developed and developing countries worldwide. They affect mainly, children less than 24 months of age. Rotavirus gastroenteritis is responsible for approximately 45% of severe infection in infants and young children throughout the world. This study was proposed to isolate and to adapt human strains of rotavirus in MA-104 (African Green monkey fetal kidney) cell culture. Clarified and decontaminated fecal homogenates positive for rotavirus (by commercial kits, polyacrylamide gel electrophoresis, electron microscopy, and RT-PCR) were submitted to cell culture inoculation. Fifty-three positive fecal specimens were submitted to at least three blind passages in cell culture before discarded as non-cultivable. The isolation/adaptation procedure was monitored by the development of the cytopathic effect (CPE), immunofluorescence assay (IFA), plaque assay (PA) and RT-PCR. Twelve specimens demonstrated evidence of cell culture adaptation when monitored by the observation of the typical rotavirus CPE. Moreover, granular specific fluorescence with a predominant perinuclear distribution was demonstrated when infected cultures were submitted to IFA. The strains isolation was also confirmed by the development of plaque with varied diameter, as well as, by the amplification of the genoma of adapted virus by RT-PCR.

Keywords: Microbiology. Cell culture. Gastroenteritis.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Estimativa global da prevalência da infecção por rotavírus (PARASHAR *et al.*, 2003)..... 11
- Figura 2** – Representação esquemática da partícula de rotavírus. Representações da superfície das estruturas tridimensionais da camada externa da partícula completa (esquerda) e uma partícula (direita) na qual a camada externa e uma pequena porção triangular da camada intermediária foram removidas, expondo a camada mais interna (KAPIKIAN *et al.*, 2001) 13
- Figura 3** – Padrão de migração eletroforética do RNA de rotavírus animais. O número entre parêntesis identifica o sorotipo G com base na especificidade da VP7, seguido dos hospedeiros nos quais o vírus foi detectado (KAPIKIAN *et al.*, 2001) 15
- Figura 4** – Partículas de rotavírus (amostra HL141). Procedimento: imunoeletromicroscopia (soro murino anti-rotavírus suíno diluído a 1:100 em PBS). Contraste negativo com fosfotungstato de potássio a 2%. Barra: 100nm.....27
- Figura 5** – Células MA-104 que não foram inoculadas com a cepa viral (controle)..28
- Figura 6** – Células MA-104 apresentando efeito citopático causado por rotavírus (amostra HC49)29
- Figura 7** – Cultura de células MA-104 infectada com a cepa HC49 submetida à reação de imunofluorescência indireta 48 h pós-infecção (aumento 400X).....30
- Figura 8** – Cultura de células MA-104 infectada com a cepa HC49 diluída de 10^1 a 10^{-5} (A a E) (F controle de células) apresentando plaques grandes e pequenos (setas), 72 h pós-infecção. Coloração: cristal violeta.....30
- Figura 9** – Eletroforese em gel de agarose do produto da PCR para VP7. PM: marcador de massa molecular 100 pb. Massa molecular do amplificado: 158pb. Amostras: 1-HL37, 2-HL73; 3-HC30; 4-HC49; 5-HC10; 6-HL14; 7-HC20; 8-HC65; 9-HC2731

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 PROPRIEDADES GERAIS DO ROTAVÍRUS.....	12
1.2 CLASSIFICAÇÃO	13
1.3 PATOGENIA	16
1.4 REPLICAÇÃO DOS ROTAVÍRUS	17
1.5 VACINA	19
1.6 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL.....	19
2 OBJETIVOS	21
2.1 GERAL	21
2.2 ESPECÍFICO.....	21
3 MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1 CULTURA DE CÉLULAS	22
3.2 AMOSTRAS FECAIS	22
3.3 INOCULAÇÃO DOS HOMOGENATOS FECAIS EM CULTURAS DE CÉLULAS.....	23
3.4 ESTOQUE VIRAL	23
3.5 EXTRAÇÃO DE RNA VIRAL PELO MÉTODO FENOL/CLOROFÓRMIO	23
3.6 EXTRAÇÃO DE RNA VIRAL PELO MÉTODO DE ISOTIOCIANATO DE GUANIDINA.....	24
3.7 ELETROFORESE DO RNA VIRAL EM GEL DE POLIACRILAMIDA (HERRING <i>ET AL.</i> , 1982, COM MODIFICAÇÕES)	24
3.8 ENSAIO DE PLAQUE	25
3.9 REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA (RIF)	26
3.10 IMUNOELETROMICROSCOPIA (ALMEIDA <i>ET AL.</i> , 1979, COM MODIFICAÇÕES).....	26
3.11 PCR PARA TIPAGEM G DO ROTAVÍRUS.....	27
4 RESULTADOS	28
REFERÊNCIAS	34

APÊNDICES	43
Apêndice A – Isolation of Human Rotavirus in Cell Culture.....	44
ANEXOS	54
Anexo 1 – Soluções	55
Anexo 2 – Reagentes	61

1 INTRODUÇÃO

O rotavírus é um patógeno comum, principal causador de gastroenterite em crianças em todo o mundo e acomete, principalmente, crianças abaixo de 24 meses de idade (KAPIKIAN *et al.*, 2001). A infecção é responsável por aproximadamente 45% das doenças diarréicas severas em recém-natos e crianças tanto em países desenvolvidos quanto países em desenvolvimento (PARASHAR *et al.*, 2000). A infecção é mais devastadora em países em desenvolvimento onde a estimativa é que ocorram 600.000 mortes anualmente (GLASS *et al.*, 1997). Há uma avaliação mundial, que a cada ano o vírus cause, aproximadamente, 111 milhões de episódios de gastroenterite que requeiram cuidados caseiros, 25 milhões de visitas médicas e dois milhões de hospitalizações de crianças com menos de cinco anos de idade (PARASHAR *et al.*, 2003) (Fig. 1).



Figura 1 – Estimativa global da prevalência da infecção por rotavírus (PARASHAR *et al.*, 2003).

Crianças de baixo nível socioeconômico e recém-natos prematuros têm um risco elevado para hospitalização devido à gastroenterite, incluindo a de origem viral (NEWMAN *et al.*, 1999).

Historicamente, a diarréia viral, então denominada de diarréia aguda não- bacteriana, foi sempre alvo de muito interesse dada a sua importância médica e epidemiológica.

Mesmo com o advento da tecnologia de cultura de células, nas décadas de 50 e 60, até a década de 70, a doença permaneceu sem a caracterização do seu agente etiológico em recém nascidos e crianças (YOW *et al.*, 1970). Somente no início da década de 70 é que a associação da diarreia severa endêmica foi estabelecida com um vírus, inicialmente, denominado de reovírus-like. Os primeiros relatos científicos desta associação foram realizados a partir de estudos em microscopia eletrônica, respectivamente, de mucosa duodenal (BISHOP *et al.*, 1973) e material fecal, originários de pacientes infantis acometidos de diarreia aguda.

Apesar de o vírus humano ter sido identificado somente na década de 70, já havia relatos da existência de vírus semelhante em animais (ADAMS & KRAFT, 1963; MALHERBE & HARWIN, 1963; MALHERBE & STRICKLAND-CHOLMLEY, 1967; MEBUS *et al.*, 1969).

1.1 PROPRIEDADES GERAIS DO ROTAVÍRUS

Os rotavírus estão incluídos no gênero de mesmo nome, pertencente à família *Reoviridae*. O nome é derivado do latim “*rota*”, que significa roda, por causa do seu aspecto circular, semelhante à roda de carroça, observado na microscopia eletrônica (KAPIKIAN & CHANOCK, 1996). São vírus relativamente grandes, de 70 nm de diâmetro, sem envelope e apresentam 11 segmentos de RNA de fita-dupla. O capsídeo icosaédrico é duplo e constituído por tripla camada protéica. Cada segmento de RNA codifica uma proteína com exceção do segmento 11, que codifica duas proteínas. Destas 12 proteínas, seis são estruturais, as chamadas VP (Viral Protein) e 6 não-estruturais, as NSP (Non Structural Protein). A camada mais interna é constituída pela proteína VP2, a camada intermediária é formada por VP6 e a camada mais externa é composta de duas proteínas, VP4 e VP7. (ESTES, 2001) (Fig. 2).

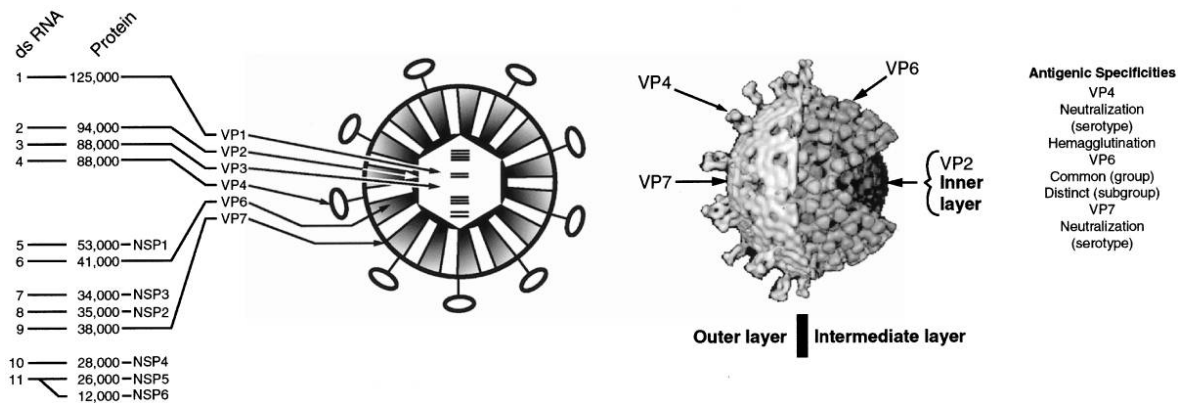


Figura 2 – Representação esquemática da partícula de rotavírus. Representações da superfície das estruturas tridimensionais da camada externa da partícula completa (esquerda) e uma partícula (direita) na qual a camada externa e uma pequena porção triangular da camada intermediária foram removidas, expondo a camada mais interna (KAPIKIAN *et al.*, 2001).

A proteína VP4 está envolvida na ligação e penetração do vírus às células, na penetração celular, na hemaglutinação, além da neutralização e virulência (ESTES, 2001). A VP4 é susceptível à proteólise, sua clivagem aumenta a infecciosidade na ordem de 100 vezes e facilita a entrada do vírus na célula (KALJOT *et al.*, 1988). Durante a proteólise, a VP4 é clivada em VP8* e VP5* e os produtos da clivagem permanecem associados no vírion (FIORE *et al.*, 1991).

Quanto a VP7, avalia-se que ela possa modular a função de VP4 durante o processo de ligação e entrada na célula (BEISNER *et al.*, 1998).

A atividade da transcriptase é observada *in vitro* quando a VP4 e VP7 são removidas das partículas virais de tripla-camada pelo tratamento com agentes quelantes de cálcio, tratamento este que resulta em partículas de dupla-camada (ESTES & COHEN, 1989).

1.2 CLASSIFICAÇÃO

A classificação sorológica dos rotavírus obedece a três níveis de especificidades, ou seja: grupo (ou sorogrupo), sub-grupo e sorotipo, sendo este último definido pela VP7 ou VP4.

De acordo com a especificidade sorológica determinada pela VP6, os rotavírus são classificados em sete grupos de A a G. As cepas humanas pertencem aos grupos A-C, porém, as mais frequentes são as do grupo A. Os vírus dos grupos de D-G foram descritos somente em animais. Diferenças sorológicas possibilitam ainda a classificação de muitas cepas em sub-grupos I e II.

Baseado nas especificidades de VP7 (**G**licoproteína) e VP4 (sensível à **P**rotease), os vírus são classificados em sorotipos G1-G14 e P1-P12, respectivamente.

Os vírus ainda podem ser classificados com base na seqüência de nucleotídeos dos genes VP7 e VP4 em genótipos G1-G16 (GULATI *et al.*, 2006) e P1-P27, respectivamente (KHAMRIN *et al.*, 2007).

A nomenclatura genotípica da linhagem de rotavírus é baseada na combinação G e P.

As linhagens de rotavírus podem ser distinguidas pelos padrões de migração dos segmentos de RNA por eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA). Estes segmentos são numerados em ordem de migração, sendo o segmento de menor mobilidade designado gene 1, e assim, sucessivamente, até o 11º segmento, de maior mobilidade (HOLMES, 1983) (Fig. 3). De acordo com a mobilidade eletroforética dos segmentos, os vírus foram classificados como grupo A, caracterizado por apresentar os 4 segmentos maiores próximos (classe I, segmentos 1-4), 2 segmentos médios (classe II, segmentos 5 e 6), 3 pequenos (classe III, segmentos 7-9) e 2 segmentos menores (classe IV, segmentos 10 e 11) (KAPIKIAN & CHANOCK, 1996). A eletroferotipagem é uma ferramenta importante nas investigações epidemiológicas e taxonômicas das linhagens (HERRMANN & BLACKLOW, 1995). Esta técnica permitiu ainda que as cepas fossem diferenciadas em padrão eletroforético S (short) e L (long), respectivamente, de acordo com a menor e maior mobilidade dos segmento 11. Em alguns rotavírus humanos, o segmento 11 se posiciona entre o 9 e o 10, perfil S, que adicionalmente, foi relacionado ao subgrupo I, definido com base sorológica. O perfil L é característico de quase todos os vírus do subgrupo II. Existe ainda um terceiro perfil eletroforético, denominado SS (super-short), em que o segmento 11 migra mais lentamente do que no perfil S e tem sido encontrado em humanos e bovinos (ALBERT *et al.*, 1987).

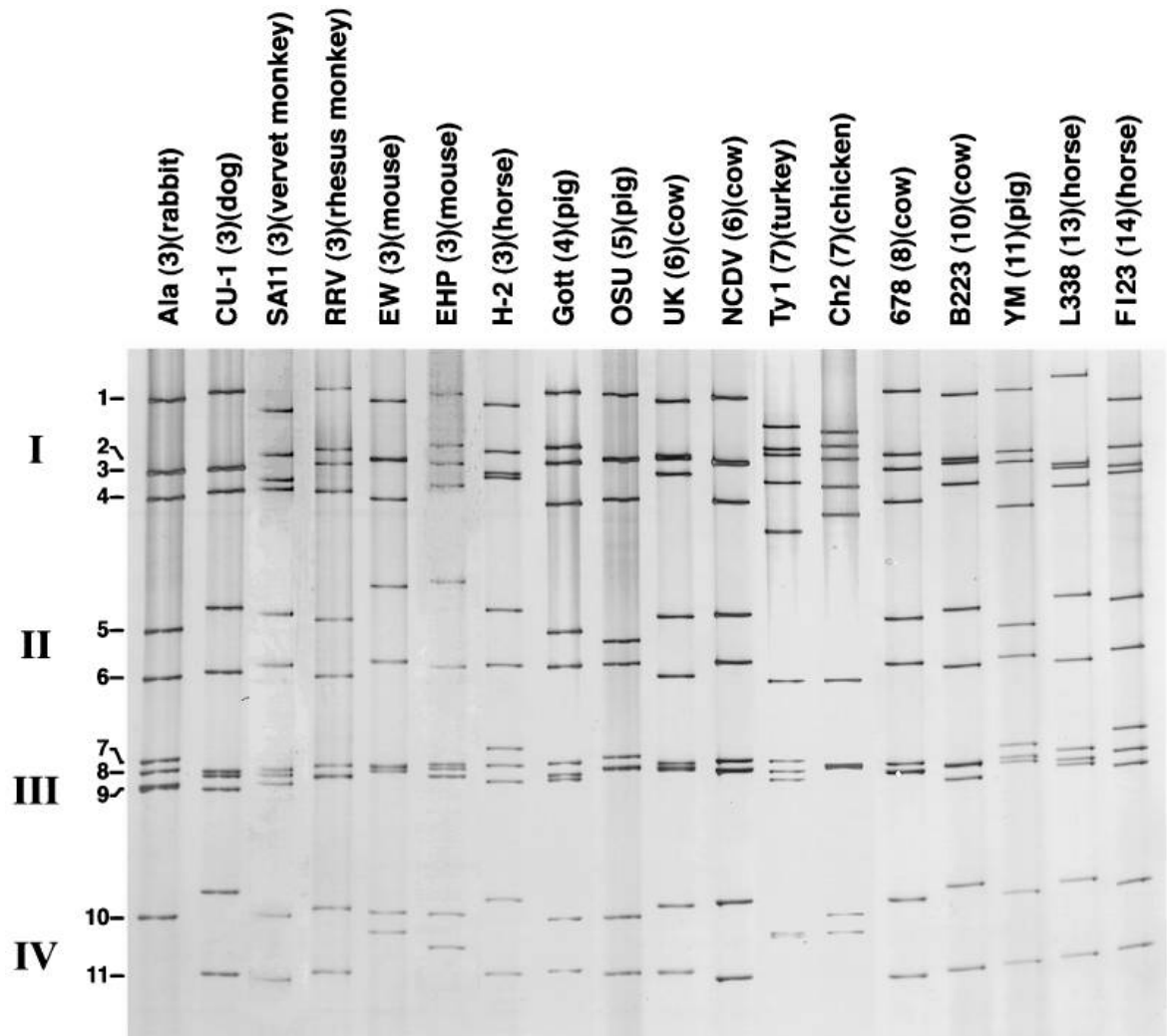


Figura 3 – Padrão de migração eletroforética do RNA de rotavírus animais. O número entre parêntesis identifica o sorotipo G com base na especificidade da VP7, seguido dos hospedeiros nos quais o vírus foi detectado (KAPIKIAN *et al.*, 2001).

Entretanto, alguns rotavírus do grupo A apresentam nuances neste padrão de migração. Por exemplo, no rotavírus murino o segmento 10 migra muito mais próximo ao segmento 11 (SMITH & TZIPORI, 1979).

Variações nas massas moleculares dos segmentos genômicos de rotavírus de uma espécie são observadas com implicações epidemiológicas (ESPEJO *et al.*, 1980; TODD *et al.*, 1980). Observou-se, posteriormente, que rotavírus humano exibia uma variedade de eletroferotipos e que estes padrões diferenciavam-se daqueles observados com linhagens animais. No entanto, em termos práticos, não há relação direta das diferenças do padrão eletroforético com a especificidade antigênica, definida por teste de neutralização. Estudos subseqüentes

indicaram que os vírus do mesmo sorotipo podem demonstrar diferentes eletroferotipos e que os vírus do mesmo eletroferotipo podem pertencer a diferentes sorotipos (KAPIKIAN *et al.*, 2001).

Com base na genotipagem até recentemente, considerava-se a predominância global de quatro linhagens comuns, a saber: G1P[8], G3P[8], G4P[8], e G2P[4], inclusive para o desenvolvimento de vacina (GENTSCH *et al.*, 1996). No entanto, na última década, a intensificação na vigilância epidêmico-molecular do vírus, aliado ao desenvolvimento e ao refinamento dos métodos de caracterização, resultou na detecção de novos genótipos humanos, tais como, G5 e G9, assim como novos recombinantes, G9P[6] e G8P[6] (DAS *et al.*, 1994; GOUVEA *et al.*, 1994; CUNLIFFE *et al.*, 1999).

Embora a natureza segmentada do genoma do vírus permita a recombinação gênica durante a infecção mista *in vivo*, estudos anteriores sugeriram que os tipos G da maioria das linhagens eram, predominantemente, associados com um único tipo P, padrão eletroforético, e especificidade de subgrupo (GENTSCH *et al.*, 1996). Esta conclusão foi, parcialmente, comprovada através dos estudos de hibridização RNA-RNA, nos quais a troca de segmentos gênicos entre os principais genótipos, representados por linhagens com padrão eletroforético longo e curto, foi considerado um evento, relativamente, restrito (NAKAGOMI *et al.*, 1989). Os sorotipos G1, G3 e G4, mais comuns no mundo, estão mais frequentemente associados com P[8], perfil eletroforético longo, e especificidade antigênica de subgrupo II, pertencente ao genogrupo Wa. Em contraste, o sorotipo G2 está associado com P[4], perfil eletroforético curto e especificidade antigênica de subgrupo I (GENTSCH *et al.*, 1996). Foram descritas combinações genotípicas distintas de G9, formadas por recombinação gênica de VP4, VP6 e VP7, entre isolados com perfil eletroforético longo e curto. Este evento sugeriu que a recombinação intergenogrupo dos genes VP4 e VP7 ocorrem em alta taxa (UNICOMB *et al.*, 1999).

1.3 PATOGENIA

Os vírions apresentam um tropismo pelos enterócitos das vilosidades intestinais. Após replicação na porção superior do intestino delgado,

partículas infecciosas são liberadas no lúmen intestinal e acometem áreas distais do intestino delgado. A infecção é, geralmente, restrita a mucosa intestinal. Embora os rotavírus possam ser encontrados na lâmina própria e regiões linfáticas, a disseminação sistêmica não é freqüente nem mesmo em pessoas imunocomprometidas (KAPIKIAN & CHANOCK, 1996).

A eficiente replicação do vírus nos enterócitos, que provoca a descamação dos mesmos, contribui para o grande número de partículas virais encontradas nas fezes dos indivíduos infectados, principalmente, nos primeiros três dias após o início da infecção. Estudos sugerem que a diarreia induzida pelos rotavírus resulta de um desequilíbrio do sistema de transporte de sódio/glicose e baixa atividade dissacaridásica na luz intestinal. Entretanto, outros mecanismos são propostos, tais como o efeito enterotoxigênico da NSP-4 viral associado à estimulação do sistema nervoso entérico (LUNDGREN & SVENSSON, 2001).

A transmissão do rotavírus é feita pela via fecal-oral (DENNEHY *et al.*, 1998), todavia, existem especulações de uma possível transmissão via respiratória (GURWITH *et al.*, 1981; GORDON, 1982; COOK *et al.*, 1990).

A infecção por rotavírus pode desenvolver quadros que variam entre diarreia branda a severa e algumas vezes desidratação fatal (KAPIKIAN & CHANOCK, 1985). No entanto, a tríade clássica da infecção é febre, vômito e diarreia (KOVACS *et al.*, 1987). A desidratação é um sinal relacionado mais fortemente à infecção e, quando severa, é potencialmente fatal (KAPIKIAN *et al.*, 1982), tornando os rotavírus a causa mais importante de desidratação em comparação com outras causas de gastroenterite (OFFIT, 1998). Além disso, uma infecção primária é mais passível de ser grave do que infecções subseqüentes. A desnutrição e imunodeficiência, geralmente, cooperam com a gravidade da doença (CORNELL, 1997).

1.4 REPLICAÇÃO DOS ROTAVÍRUS

Evidências indicam que a ligação do vírus à célula ocorre via VP4 (RUGGERI & GREENBERG, 1991; CRAWFORD *et al.*, 1994), através do peptídeo VP5* (ZARATE *et al.*, 2000).

A entrada do rotavírus na célula é um processo de várias etapas que pode envolver a participação de ácido siálico, nos receptores, na etapa de ligação inicial à célula, e integrinas durante a etapa subsequente (COULSON *et al.*, 1997; GUERRERO *et al.*, 2000; HEWISH *et al.*, 2000; ZARATE *et al.*, 2000). Clivagem proteolítica de VP4 aumenta em várias vezes a infecciosidade (ESTES *et al.*, 1981; ARIAS *et al.*, 1996) e facilita a entrada do vírus nas células (KALJOT *et al.*, 1988).

A síntese de transcritos virais é mediada por uma RNA polimerase viral (transcriptase) RNA – dependente (LAWTON *et al.*, 1997). A transcrição é assimétrica e a partir da fita de polaridade negativa do RNA genômico são transcritas as fitas de polaridade positiva (MCCRAE & MCCORQUODALE, 1983).

A maioria das proteínas estruturais e não-estruturais são sintetizadas nos ribossomas livres. Por outro lado, as glicoproteínas VP7 e NSP4 são sintetizadas nos ribossomas associados à membrana do retículo endoplasmático rugoso (RER), onde são processadas (ESTES, 2001).

A montagem do vírus ocorre inicialmente dentro de estruturas citoplasmáticas denominadas viroplasmas (PETRIE *et al.*, 1984) e, posteriormente, a partícula sofre maturação dentro do RER.

A progênie viral é liberada através da lise celular.

1.5 VACINA

A primeira vacina humana foi desenvolvida a partir de linhagens bovinas atenuadas (CLARK *et al.*, 1996a, b), em seguida utilizaram-se linhagens de macaco e recombinantes Rhesus-humana (MIDTHUN & KAPIKIAN, 1996; KAPIKIAN *et al.*, 1996). Mais recentemente, linhagens recombinantes bovino-humana foram usadas (HEATON *et al.*, 2005) e linhagens humana atenuadas (SALINAS *et al.*, 2005). A vacina tetravalente Rhesus-humana (RRV-TV) mostrou ser efetiva nos Estados Unidos (RENNELS *et al.*, 1996; SANTOSHAM *et al.*, 1997), Finlândia (JOENSUU *et al.*, 1997), Venezuela (PEREZ-SCHAEL *et al.*, 1997) e Peru (LANATA *et al.*, 1996). Demonstrou reduzir o risco de diarreia severa em 50% e de 70-100% o risco de diarreia severa com desidratação (SCHMITZ, 1999). RRV-TV foi licenciada para uso universal nos Estados Unidos da América (EUA) em 1998

(DESSELBERGER, 1999) e retirada em 1999 devido a sua associação com intussuscepção (obstrução do intestino) (ABRAMSON *et al.*, 1999; CDC, 1999).

Em 2006, os EUA licenciaram RotaTeq, uma vacina atenuada, de uso oral que contém cinco linhagens recombinantes desenvolvidas a partir do vírus humano e bovino (HEATON *et al.*, 2005). É constituída de quatro linhagens recombinantes G1, G2, G3 ou G4 e de linhagem parental bovina. O quinto vírus recombinante apresenta P1A[8] de linhagem parental humana e G6 bovina (PARASHAR *et al.*, 2006).

Ainda em 2006, a vacina RotaRix foi licenciada em aproximadamente 30 países na América Latina, África, Ásia, em países da União Européia e foi introduzida nos programas de vacinação nacional no Brasil, Panamá e Venezuela (CUNLIFFE & NAKAGOMI, 2005). RotaRix é uma vacina monovalente baseada em uma linhagem humana atenuada, G1P1A[8]. Demonstrou uma eficácia de 85% contra a rotavirose grave em triagens recentes (SALINAS *et al.*, 2005).

KAPIKIAN *et al.* (2005) desenvolveram uma vacina recombinante humana tetravalente (UK) com especificidade para os sorotipos G1, G2, G3 e G4. Ela tem se mostrado segura, imunogênica e efetiva na prevenção da diarreia grave. Porém, por causa da emergência do sorotipo G9 e também da importância de G8, planeja-se acrescentar também recombinantes humano-bovino (UK) G8 e G9, e formular uma vacina hexavalente de uso universal.

1.6 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

As manifestações clínicas da infecção por rotavírus não são suficientes para permitir o diagnóstico apenas com base nos sintomas. Então, o diagnóstico requer detecção do vírus ou antígeno viral e/ou demonstração de uma resposta sorológica (KAPIKIAN *et al.*, 2001).

O vírus pode ser detectado em cultura de células (WYATT *et al.*, 1980). A linhagem celular de rim fetal de macaco, MA-104, tem mostrado ser a mais apropriada para a replicação do vírus (WARD *et al.*, 1984), embora outras linhagens tenham sido utilizadas, tais como, CACO2 (adenocarcinoma colo-retal humano), CV-1 (rim de macaco verde africano) e LLC-MK2 (rim de macaco Rhesus) (SMITH *et al.*,

1979; PINTO *et al.*, 1995). No entanto, a propagação do vírus em cultura é muito lenta, não tendo valor prático para diagnóstico. Por esta razão, vários ensaios têm sido desenvolvidos para detecção do rotavírus nas fezes (YOLKEN & WILDE, 1994).

O diagnóstico pode ser feito pela detecção das partículas virais nas fezes, através de microscopia eletrônica (ME) ou imunoeletromicroscopia; por detecção dos antígenos virais nas fezes por enzima imunoensaio (ELISA), imunofluorescência ou aglutinação do látex; ou por detecção do genoma viral por EGPA, reação em cadeia da polimerase associada à reação de transcrição reversa (RT-PCR) ou hibridização (SANTOS, 2002).

Para detecção do vírus, recomenda-se a coleta das fezes do primeiro ao quarto dia após o início da doença; mas, a eliminação viral pode ocorrer por até três semanas, dependendo da duração dos sintomas (RIEPENHOFF-TALTY *et al.*, 1981).

A ME tem a vantagem da alta especificidade, uma vez que o rotavírus tem uma aparência distinta. É importante no diagnóstico da doença e é frequentemente utilizada para resolver discrepâncias entre resultados obtidos por outras técnicas. Quando são analisadas poucas amostras, a ME direta é o método diagnóstico de escolha devido à rapidez, sendo que as amostras são analisadas em poucos minutos após a coleta. Esta técnica direta de análise, a partir do material fecal, permite a detecção de rotavírus em 80 a 90% das amostras (BRANDT *et al.*, 1981).

Outro método bastante utilizado, entretanto, é o enzima imunoensaio confirmatório, porque é altamente sensível e não exige equipamentos especializados (YOLKEN & WILDE, 1994). Kits comerciais estão disponíveis, mas, ensaios que não incluem reagentes confirmatórios podem render resultados falso - positivos. A reação imunoenzimática para detecção de vírus dos grupos B e C, assim como para detecção dos respectivos anticorpos foram desenvolvidos (MACKOW, 1995).

A adaptação de amostras selvagens do vírus, através do isolamento e estabelecimento *in vitro* é de extrema importância na virologia básica e aplicada. Ao dispormos de vírus adaptados em cultura de células, as análises podem ser estabelecidas em vários campos de estudo. As avaliações da interação vírus/célula podem ser realizadas como modelo para melhor entendimento da infecção viral, sejam no aspecto da patogenia da infecção, infecciosidade do agente, características biológicas do agente ou na produção de vacina.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Promover a adaptação de cepas de rotavírus humanos em cultura de células.

2.2 ESPECÍFICO

Monitorar o processo de adaptação em cultura de células através do efeito citopático (ECP) comprovando-o através de técnica sorológica, ensaio de plaque e amplificação genômica.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CULTURA DE CÉLULAS

Células MA-104 (rim fetal de macaco) foram cultivadas em Meio Mínimo Essencial modificado por Dulbecco (DMEM), acrescido de 10% de soro fetal bovino, 100 µg/ml de estreptomicina, 100UI/ml de penicilina e 2,5 µg/ml de fungizona (LINHARES *et al.*, 1989). Após um período de crescimento de aproximadamente 48 h, a 37°C, quando as monocamadas de células apresentaram-se confluentes, novos sub-cultivos foram realizados. Para os sub-cultivos, após o descarte do meio de cultura, as células foram dispersas com solução de tripsina/verseno (0,25%/0,025%). Para os experimentos de adaptação, as células utilizadas foram cultivadas em tubos de vidro 13x100mm.

3.2 AMOSTRAS FECAIS

As 53 amostras fecais estudadas estavam estocadas a - 4°C no Laboratório de Virologia, do Departamento de Microbiologia da UEL, sendo que, foram coletadas na cidade de Ponta Grossa, PR, durante o período de maio a agosto de 2003, sob a supervisão do mestre Eduardo Pietruchinski. As amostras fecais foram homogeneizadas em tampão fosfato-salina (PBS), pH 7,3, na proporção de 10% (v/v), com auxílio de pérolas de vidro, e, posteriormente, clarificadas por centrifugação a 3000 xg por 10 min. Os sobrenadantes resultantes foram tratados com 200 UI/ml de penicilina, 200 µg/ml de estreptomicina e 10 µg/ml de fungizona, e novamente centrifugados a 3000 xg durante 20 min. Os sobrenadantes assim processados foram estocados a -20°C, até o momento de uso.

3.3 INOCULAÇÃO DOS HOMOGENATOS FECAIS EM CULTURAS DE CÉLULAS

Os homogenatos fecais processados foram submetidos ao tratamento com tripsina cristalina, na concentração final de 30 µg/ml, durante 1 h a 37°C. As culturas de células com 48 h de crescimento, estabelecidas em tubos 13x100, foram inoculadas na proporção de 10% (v/v), em relação ao volume total de meio fresco. O meio fresco de manutenção, livre de soro, também foi acrescido de tripsina cristalina na concentração final de 10 µg/ml. Os sistemas assim preparados foram mantidos a 37°C e observados durante 7 dias para a detecção do efeito citopático (ECP). Quando o ECP foi evidente, as culturas foram submetidas a 3 ciclos sucessivos de congelamento/descongelamento, após o qual o homogenato celular foi centrifugado rapidamente e o sobrenadante submetido a novas passagens, com a finalidade de elevar o título viral. Culturas inoculadas com o vírus SA-11 (rotavírus símio), nas diluições de 10^{-2} e 10^{-3} foram usadas como controle positivo. Culturas não inoculadas foram mantidas como controle de células.

3.4 ESTOQUE VIRAL

As 12 cepas, provenientes do material fecal, adaptadas (HC10, HL14, HC20, HC27, HC30, HL37, HL47, HC49, HC65, HL72, HL73, HL81, HC84 e HC116) foram inoculadas em cultura de células estabelecidas em garrafas de vidro para obtenção do estoque viral, para os subseqüentes experimentos. O estoque viral foi titulado. A suspensão viral estoque foi acrescida de 2% de glicerol, aliqotado e conservado a -20°C.

3.5 EXTRAÇÃO DE RNA VIRAL PELO MÉTODO FENOL/CLOROFÓRMIO

Quatrocentos microlitros de amostra viral adaptada em cultura de células foram incubados com 40 µl de SDS 10% a 37°C por 30 min. Em seguida,

homogeneizados com 400 µl de solução de clorofórmio e fenol saturado (1:1) em agitador. Após centrifugação, a fase aquosa foi removida com cuidado e o RNA precipitado com 1 ml de etanol absoluto gelado (-20°C) e 40 µl de NaCl 20%, durante uma noite, a -20°C. Em seguida, o material foi centrifugado a 13000 xg por 10 min, o sobrenadante desprezado e o precipitado mantido em dessecador a vácuo até a utilização.

3.6 EXTRAÇÃO DE RNA VIRAL PELO MÉTODO DE ISOTIOCIANATO DE GUANIDINA

Para cada ml de homogenato de cultura de células infectadas foram adicionados 2,0 ml de isotiocianato de guanidina a 6 M (solução D). Seqüencialmente, foram adicionados à mistura 200 µl de acetato de sódio 0,2 M, 2 ml de fenol saturado, 400 µl de clorofórmio-álcool isoamílico (49:1), misturando-se por inversão, após a adição de cada reagente. A suspensão final foi agitada vigorosamente por 10 seg, resfriada no gelo por 15 min e centrifugada a 10000 xg por 20 min a 4°C. Após centrifugação, a fase aquosa foi coletada, adicionada de isopropanol gelado (-20°C) (v:v), mantida a -20°C por pelo menos 1 h e centrifugando a 10000 xg por 20 min. O pellet foi ressuspensão em solução D 4 M (300 µl) e precipitado com 1 vol de isopropanol gelado (-20°C) por 1 h. Após centrifugação a 10000 xg, por 10 min a 4°C, o pellet foi ressuspensão em etanol a 75% gelado (-20°C) e novamente sedimentado. O sedimento foi ressuspensão em 50 µl de SDS 0,5% (tratado com dietil-pirocarbonato) a 65°C por 10 min.

3.7 ELETROFORESE DO RNA VIRAL EM GEL DE POLIACRILAMIDA (HERRING *ET AL.*, 1982, COM MODIFICAÇÕES)

O preparo do gel e a aplicação das amostras foram procedidos conforme descrição sumária. Os géis concentrador e de separação foram preparados nas concentrações de 3,5% e 7%, respectivamente. As amostras de RNA viral extraídas foram ressuspensas em 50 µl de tampão dissociante. Em

seguida, 25 µl das foram aplicados nos poços do gel. Uma amostra padrão de vírus (SA-11) foi submetida ao mesmo processamento dos homogenatos fecais e usada como controle positivo. A corrida eletroforética foi realizada com uma intensidade de 25 mA por 90 min.

Após finalização da eletroforese, o gel foi fixado em uma solução de etanol 20% e ácido acético 2% por 1 h e, posteriormente, tratado com 0,011 M de nitrato de prata por 40 min. A revelação das bandas de RNA viral foi feita com hidróxido de sódio 4,5% e formaldeído 2% por cerca de 15 min. O gel foi lavado e colocado na solução bloqueadora com etanol a 10% e ácido acético a 5%. A redução do gel foi feita em solução etanol 70% por 1 h.

3.8 ENSAIO DE PLAQUE

As células foram cultivadas em placas de fundo chato, com 24 escavações, e após confluência da monocamada próxima a 90%, foram inoculadas com 100 µl da diluição viral em estudo e, em seguida, incubadas a 37°C por 2 h. Após a retirada do excesso de inóculo, as monocamadas foram recobertas com 1 ml de agarose nutriente (meio DMEM 2 vezes concentrado, acrescido de agarose 1,5%, previamente fundida [v/v]) à temperatura de 46°C. Após solidificação da agarose nutriente, as placas foram incubadas, em posição invertida, a 37°C com tensão de 5% de CO₂, por, aproximadamente, cinco dias. Após este período, a agarose foi retirada, evitando-se a danificação da monocamada celular e fixada com formaldeído a 10% em PBS, pH 7,3, por 24 h, à temperatura ambiente. A monocamada celular foi corada com solução alcoólica a 20% de cristal violeta a 0,5% (LONIEN *et al.*, 2001).

O título viral foi determinado pela contagem dos plaques, sendo que, o número de unidade formadora de plaque (UFP) foi calculado segundo ROVOZZO & BURKE (1973), pela fórmula: $N = Y / V \cdot X$ onde:

$N = \text{UFP/ml}$

$Y = \text{número médio de plaques contados}$

$V = \text{volume (ml) do inóculo}$

$X = \text{diluição do inóculo}$

3.9 REAÇÃO DE IMUNOFLOURESCÊNCIA (RIF):

Células MA-104 foram cultivadas em tubos de Leighton com lamínulas, por 48 h, foram inoculadas com amostras de rotavírus para avaliação da replicação viral. Após infecção, as culturas foram lavadas com PBS, pH 7,3 e fixadas com acetona gelada (-20°C) por 20 min. As lamínulas foram incubadas com soro de camundongo anti-rotavírus, diluído em PBS, pH 7,3, em câmara úmida a 37°C por 30 min, seguindo de 3 lavagens, durante cinco minutos cada, em PBS e incubada com soro de coelho anti-imunoglobulina G de camundongo conjugado com isotiocianato de fluoresceína (ITCF) diluído em PBS. Seguiu-se a incubação durante 30 min a 37°C em câmara escura e úmida. As células foram lavadas mais 3 vezes com PBS, secas ao ar e montadas em lâminas com solução tamponada de glicerina a 50% em PBS e observadas em microscópio de fluorescência (RAMOS *et al.*, 2000).

3.10 IMUNOELETROMICROSCOPIA (ALMEIDA *ET AL.*, 1979, COM MODIFICAÇÕES):

Padronização da concentração do soro-anti rotavírus.

Um vol. de um homogenato fecal a 20% clarificado (positivo) foi adicionado a 1 vol de soro murino anti-rotavírus suíno, nas diluições de 1/50, 1/100 e 1/1000 em PBS. Após incubação a 37°C por 1 h, os preparados foram centrifugados a 13000 xg/30 min e o precipitado ressuspense em 50 µl de água destilada. Foram usadas grades de cobre de 400 (mesh), recobertas com Formvar, e a técnica de contraste negativo procedida de acordo com RAMOS *et al.* (2000) (Fig.4).

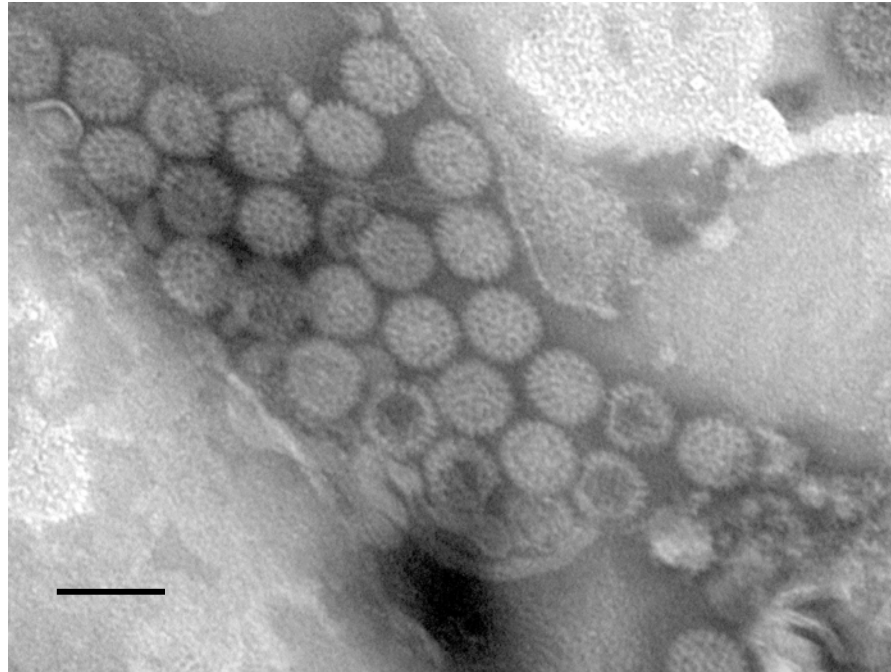


Figura 4 – Partículas de rotavírus (amostra HL141).
Procedimento: imunoeletromicroscopia (soro murino anti-rotavírus suíno diluído a 1:100 em PBS).
Contraste negativo com fosfotungstato de potássio a 2%. Barra: 100nm.

3.11 PCR PARA TIPAGEM G DO ROTAVÍRUS

O RNA fita dupla viral foi extraído a partir do homogenato de células infectadas utilizando o kit *RNAgents Total Isolation System* e submetido à transcrição reversa, seguida por multiplex PCR. Foi utilizado um pool de primers denominado C (DAS *et al.*, 1994), contendo os primers específicos para G1, G2, G3, G4, G9 e G12. As amostras de RNA viral foram submetidas a um ciclo de transcrição reversa (42°C, 45 min). O PCR foi executado em 30 ciclos. Cada ciclo incluiu processos de 30 seg a 94°C, 60 seg a 40°C e 90 min a 72°C, e um ciclo de extensão final de 72°C/5 min. Os produtos da amplificação foram visualizados pela coloração com brometo de etídio.

4 RESULTADOS

Cinquenta e três amostras fecais foram clarificadas, descontaminadas e submetidas à, pelo menos, três passagens cegas. Estas passagens foram realizadas com diluições decimais do homogenato de culturas infectadas, a partir de culturas originalmente inoculadas com material fecal. Nestas passagens, o efeito citopático (ECP) começou a ser definido (Fig. 5 e Fig. 6).

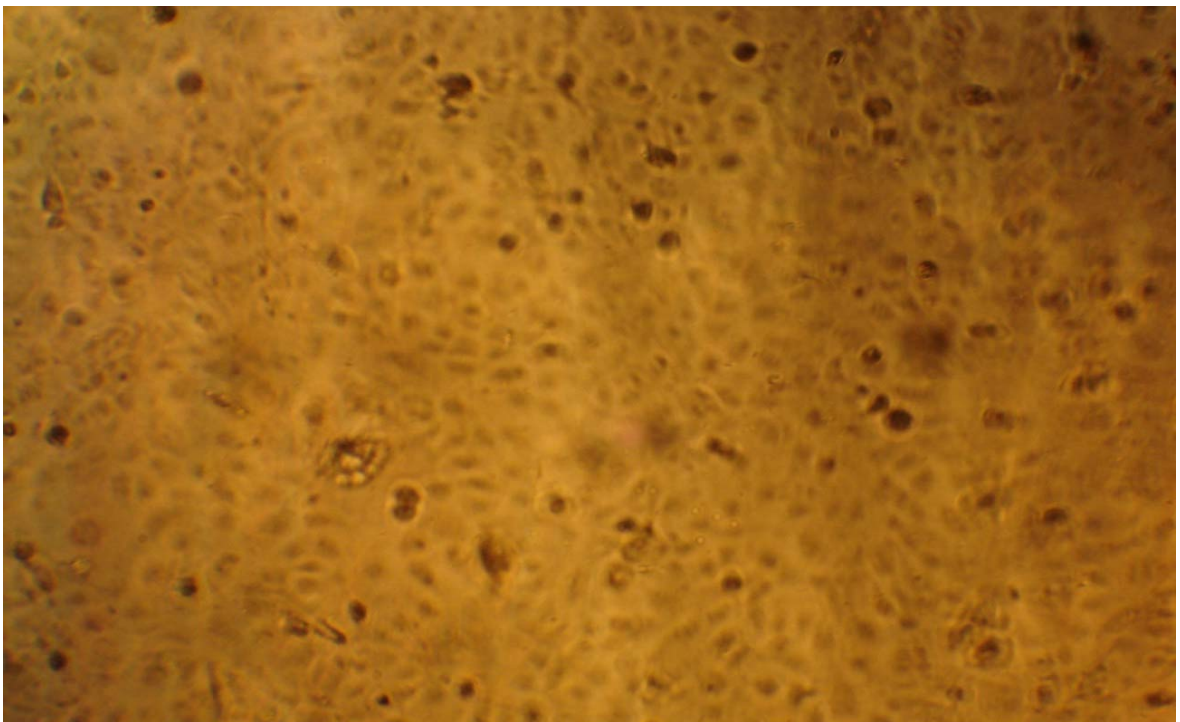


Figura 5 – Células MA-104 que não foram inoculadas com a cepa viral (controle).

Quatorze das 53 amostras foram adaptadas em cultura de células, tendo sido utilizado o rotavírus símio (SA-11) como controle positivo. A primeira evidência da adaptação foi o delineamento de um ECP nas primeiras passagens (1ª até 3ª) que culminou com a evolução de um ECP típico, após a 3ª passagem. Os seguintes aspectos de alteração de forma das células infectadas foram demonstrados: as células tornaram-se granulares, houve arredondamento celular, e a ocorrência de células fusiformes/repuxadas em focos isolados. Posteriormente, houve disseminação deste efeito no restante do tapete celular. Seguiu-se ao

descolamento das células do tapete. O ECP mostrou-se semelhante ao da cepa SA-11, usada como controle positivo.

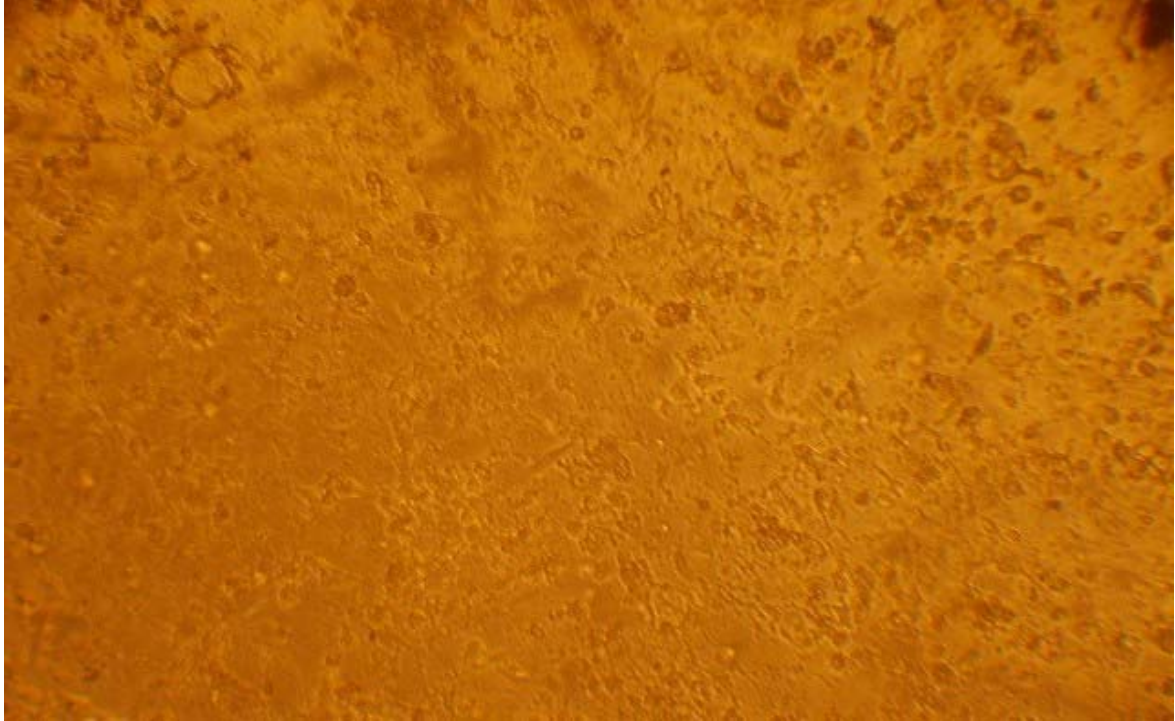


Figura 6 – Células MA-104 apresentando efeito citopático causado por rotavírus (amostra HC49).

Pela RIF foi possível observar células apresentando fluorescência específica representada pela presença de grânulos citoplasmáticos fluorescentes, com maior concentração na região perinuclear, típicos da infecção pelo rotavírus, em 14 amostras adaptadas (Fig. 7).

As cepas humanas adaptadas foram submetidas ao ensaio de plaque também com intuito de comprovação. Este ensaio demonstrou que 12 cepas apresentaram plaques com bordas irregulares, sem limites definidos, distinguíveis em tamanho, predominantemente, plaques grandes e pequenos.

Dez amostras produziram plaques com predomínio de plaques pequenos com diâmetro médio de 0,07mm, enquanto duas amostras produziram plaques, predominantemente, grandes com diâmetro médio de 0,26mm (Fig. 8).



Figura 7 – Cultura de células MA-104 infectada com a cepa HC49 submetida à reação de imunofluorescência indireta 48 h pós-infecção (aumento 400X).

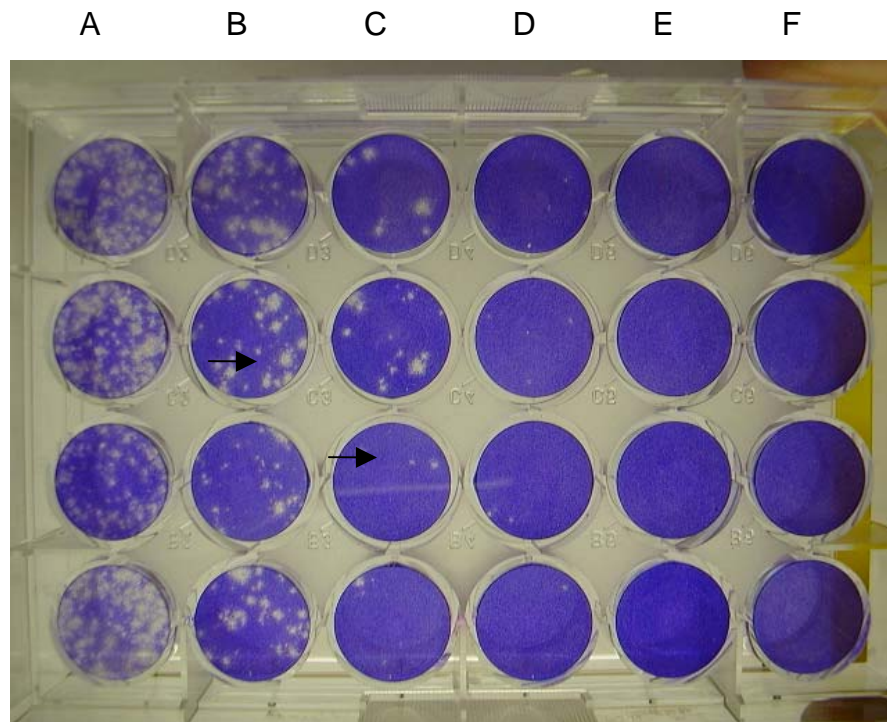


Figura 8 – Cultura de células MA-104 infectada com a cepa HC49 diluída de 10^{-1} a 10^{-5} (A a E) (F controle de células) apresentando plaques grandes e pequenos (setas), 72 h pós-infecção. Coloração: cristal violeta.

As amostras adaptadas que apresentaram positividade em ECP, RIF e capacidade de formação de plaques foram submetidas à EGPA. A extração do RNA viral foi executada pelo método tradicional de fenol-clorofórmio e pelo método de isotiocianato de guanidina, no entanto, as técnicas não foram capazes de detectar o RNA viral em nenhuma das amostras adaptadas.

A técnica de RT-PCR para o gene da VP7 demonstrou que de nove cepas adaptadas oito permitiram amplificação tendo sido ratificado o genótipo G1 (Fig. 9). A Tabela 1 demonstra a compilação dos dados e resultados obtidos.

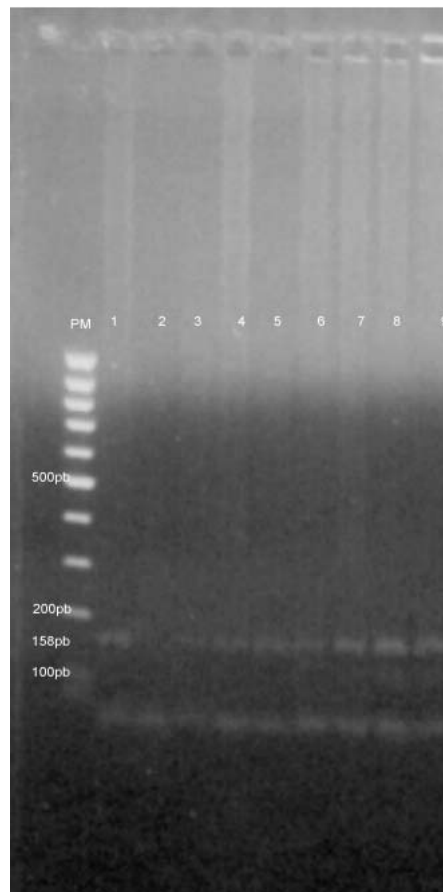


Figura 9 – Eletroforese em gel de agarose do produto da PCR para VP7. PM: marcador de massa molecular 100 pb. Massa molecular do amplificado: 158pb. Amostras: 1-HL37, 2-HL73; 3-HC30; 4-HC49; 5- HC10; 6-HL14; 7-HC20; 8-HC65; 9-HC27.

Tabela 1 – Compilação dos dados e resultados obtidos.

Número	Amostra inoculada em MA-104	ECP	RIF	EP	RT-PCR
1	HC10	+	+	+	+
2	HL14	+	+	+	+
3	HC20	+	+	+	+
4	HC27	+	+	+	+
5	HL29	-	-	NR	NR
6	HC30	+	+	+	+
7	HL37	+	+	+	+
8	HC39	-	-	NR	NR
9	HC40	-	-	NR	NR
10	HL44	-	-	NR	NR
11	HL47	+	+	+	NR
12	HC49	+	+	+	+
13	HL53	-	-	NR	NR
14	HC56	-	-	NR	NR
15	HC65	+	+	+	+
16	HC70	-	-	NR	NR
17	HL72	+	+	+	NR
18	HL73	+	+	+	-
19	HL80	-	-	NR	NR
20	HL81	+	+	-	NR
21	HC83	-	-	NR	NR
22	HC84	+	+	-	NR
23	HC87	-	-	NR	NR
24	HC91	-	-	NR	NR
25	HC92	-	-	NR	NR
26	HC94	-	-	NR	NR
27	HL95	-	-	NR	NR
28	HC96	-	-	NR	NR
29	HL108	-	-	NR	NR
30	HC111	-	-	NR	NR
31	HC113	-	-	NR	NR
32	HC115	-	-	NR	NR
33	HC116	+	+	+	NR
34	HC120	-	-	NR	NR
35	HC126	-	-	NR	NR
Número	Amostra	ECP	RIF	EP	RT-PCR

36	HC127	-	-	NR	NR
37	HC128	-	-	NR	NR
38	HL141	-	-	NR	NR
39	HC145	-	-	NR	NR
40	HC147	-	-	NR	NR
41	HC152	-	-	NR	NR
42	HC155	-	-	NR	NR
43	HC168	-	-	NR	NR
44	HC175	-	-	NR	NR
45	HC190	-	-	NR	NR
46	HC198	-	-	NR	NR
47	HC205	-	-	NR	NR
48	HC208	-	-	NR	NR
49	HC214	-	-	NR	NR
50	HC217	-	-	NR	NR
51	HL220	-	-	NR	NR
52	HC233	-	-	NR	NR
53	HC235	-	-	NR	NR

Legenda:

- ECP (efeito citopático), RIF (reação de imunofluorescência), EP (ensaio de plaque) e RT-PCR (reação em cadeia da polimerase associada à transcrição reversa) positividade para a VP7.
- (+): positivo; (-): negativo; NR: não realizado

REFERÊNCIAS

ABRAMSON JS, BAKER CJ, FISHER MC, GERBER MA, MEISSNER HC, MURRAY DL, OVERTURF GD, PROBER CG, RENNELS MB, SAARI TN, WEINER LB, WHITLEY RJ, PICKERING LK, AAP COMMITTEE ON INFECTIOUS DISEASES. Possible association of intussusception with rotavirus vaccination. *Pediatrics* 1999; 104:575.

ADAMS WR, KRAFT LM. Epizootic diarrhea of infant mice: identification of the etiologic agent. *Science* 1963; 141: 359-360.

ALBERT MJ, UNICOMB LE, BISHOP RE. Cultivation and characterization of human rotaviruses with "super short" RNA patterns. *Journal of Clinical Microbiology* 1987; 25: 183-185.

ALMEIDA JD, ATANASUI P, BRADLEY DW, GARDNER PS, MAYNARD J, SCHWERS AW, VOLLER A, YOLKEN RH. Manual for rapid laboratory viral diagnosis. WHO Offset Publication 1979; 47: 7-10.

ARIAS CF, ROMERO P, ALVAREZ V, LOPEZ S. 1996. Trypsin activation pathway of rotavirus infectivity. *Journal of Virology* 1996; 70: 5832–5839.

BEISNER B, KOOL D, MARICH A, HOLMES IH. Characterisation of G serotype dependent non-antibody inhibitors of rotavirus in normal mouse serum. *Archives of Virology* 1998; 143: 1277–1294.

BISHOP RF, DAVIDSON GP, HOLMES IH, RUCK BJ. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. *Lancet* 1973; 2: 1281-1283.

BRANDT CD, KIM HW, RODRIGUEZ WJ, THOMAS L, YOLKEN RH, ARROBIO JO, KAPIKIAN AZ, PARROTT RH, CHANOCK RM. Comparison of direct electron microscopy, immune electron microscopy and rotavirus enzyme-linked immunosorbent assay for detection of gastroenteritis viruses in children. *Journal of Clinical Microbiology* 1981; 13(5): 976-981.

CDC. Intussusception among recipients of Rotavirus Vaccine -- United States, 1998-1999. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 1999; 48(27): 577-581.

CLARK HF, OFFIT PA, ELLIS RW, KRAH D, SHAW AR, EIDEN JJ, PICHICHERO M, TREANOR JJ. WC3 reassortant vaccines in children. *Archives of Virology. Supplementum* 1996a; 12: 187-198.

CLARK HF, OFFIT PA, ELLIS RW, EIDEN JJ, KRAH D, SHAW AR, PICHICHERO M, TREANOR JJ, BORIAN FE, BELL LM, PLOTKIN SA. The development of multivalent bovine rotavirus (strain WC3) reassortant vaccine for infants. *The Journal of Infectious Diseases* 1996b; 174 Suppl 1:S73-S80. Review.

COOK SM, GLASS RI, LEBARON CW, HO M-S. Global seasonality of rotavirus infections. *Bulletin of the World Health Organization* 1990; 68: 171-177.

CORNELL SL. Confronting the consequences of rotavirus: diarrhea and dehydration. *Advance for Nurse Practitioners* 1997; 5: 41-44.

COULSON BS, LONDRIGAN SL, LEE DJ. Rotavirus contain integrin ligand sequences and a desintegrin-like domain that are implicated in virus entry into cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America* 1997; 94: 5389-5394.

CRAWFORD SE, LABBE M, COHEN J, BURROUGHS MH, ZHOU YJ, ESTES MK. Characterization of virus-like particles produced by the expression of rotavirus capsid proteins in insect cells. *Journal of Virology* 1994; 68:5945-5952.

CUNLIFFE NA, NAKAGOMI O. A critical time for rotavirus vaccines: a review. *Expert Review of Vaccines* 2005; 4: 521-532.

CUNLIFFE NA, GONDWE JS, BROADHEAD ME, MOLYNEUX ME, WOODS PA, BRESEE JS, GLASS RI, GENTSCH JR, HART CA. Rotavirus G and P types in children with acute diarrhea in Blantyre, Malawi, from 1997 to 1998: predominance of novel P[6]G8 strains. *Journal of Medical Virology* 1999; 57: 308-312.

DAS BK, GENTSCH JR, CICIRELLO HG, WOODS PA, GRUPTA A, RAMACHANDRAN M, KUMAR R, BHAN MK, GLASS RI. Characterization of rotavirus strains from newborns in New Delhi, India. *Journal of Clinical Microbiology* 1994; 32: 1820-1822.

DENNEHY PH, NELSON SM, CROULEY BA, SARACEN CL. Detection of rotavirus RNA in hospital air samples by polymerase chain reaction (PCR). *Pediatric Research* 1998; 43: 143A.

DESSELBERGER U. Rotavirus infections: guidelines for treatment and prevention. *Drugs* 1999; 58:447–452.

ESPEJO RT, MUÑOZ F, SERAFIN R, ROMERO P. Shift in the prevalent human rotavirus detected by ribonucleic acid segment differences. *Infection and Immunity* 1980; 27: 351-354.

ESTES MK. Rotaviruses and their replication. In: Knipe DM, Howley RM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE, editors. *Field's virology*, 4th edn. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins Co, 2001: 1747 –1785.

ESTES MK, COHEN J. Rotavirus gene structure and function. *Microbiological Reviews* 1989; 53: 410-449.

ESTES MK, GRAHAM DY, MASON BB. Proteolytic enhancement of rotavirus infectivity: molecular mechanisms. *Journal of Virology* 1981; 39: 879-888.

FIGLIORE L, GREENBERG HB, MACKOW ER. The VP8 fragment of VP4 is the rhesus rotavirus hemagglutinin. *Virology* 1991; 181: 553–563.

GENTSCH JR, WOODS PA, RAMACHANDRAN M, DAS BK, LEITE JP, ALFIERI A, KUMAR R, BHAN MK, GLASS RI. Review of G and P typing results from a global collection of strains: implications for vaccine development. *The Journal of Infectious Diseases* 1996; 174: S30-S36.

GLASS RI, BRESEE JS, PARASHAR U, MILLER M, GENTSCH JR. Rotavirus vaccines at the threshold. *Nature Medicine* 1997; 3: 1324-1325.

GORDON AG. Rotavirus infections and the Sompe syndrome [letter]. *The Journal of Infectious Diseases* 1982; 146: 117-118.

GOUVEA V, de CASTRO L, TIMENETSKY MDO C, GREENBERG H, SANTOS N. Rotavirus serotype G5 associated with diarrhea in Brazilian children. *Journal of Clinical Microbiology* 1994; 32: 1408-1409. [Erratum, 32: 1834].

GUERRERO CA, MENDEZ E, ZARATE S, ISA P, LOPEZ S, ARIAS CF. Integrin alpha(v)beta(3) mediates rotavirus cell entry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America* 2000; 97: 14644-14649.

- GULATI BR, DEEPA R, SINGH BK, RAO CD. Diversity in Indian equine rotaviruses: identification of G10, P6[1] and G1 type and a new VP7 genotype (G16) strains in diarrheic foals in India. *Journal of Clinical Microbiology* 2006; [Epub ahead of print].
- GURWITH M, WENMAN W, HINDE D, FELTHAM S, GREENBERG H. A prospective study of rotavirus infection in infants and young children. *The Journal of Infectious Diseases* 1981; 144: 218-224.
- HEATON PM, GOUVEIA MG, MILLER JM, OFFIT P, CLARCK HF. Development of a pentavalent rotavirus vaccine against prevalent serotypes of rotavirus gastroenteritis. *The Journal of Infectious Diseases* 2005; 192: S17-S21.
- HERRING AJ, IGLISIS NF, OJEH CK, SNODGRASS DR, MENZIES JD. Rapid diagnosis of viral nucleic acid in silver-stained polyacrilamide gel. *Journal of Clinical Microbiology* 1982; 16: 473-477.
- HERRMANN JE, BLACKLOW NR. Gastroenteritis viruses. *In*: LENNETTE EH, LENNETTE DA, LENNETTE ET. *Diagnostic procedures for viral, rickettsial, and chlamydial infections*. 7th ed. Washington, American Public Health Association, 1995; 313-324.
- HEWISH MJ, TAKADA Y, COULSON BS. Integrin alpha Z beta 1 and alpha 4 beta 1 can mediate SA11 rotavirus attachment and entry into cells. *Journal of Virology* 2000; 74: 228-236.
- HOLMES I. Rotaviruses. *In*: JOKLIK W, ed. *The Reoviridae*. New York, Plenum Press, 1983: 359-423.
- JOENSUU J, KOSKENNIEMI E, PANG XL & VESIKARI T. Randomised placebo-controlled trial of rhesus-human reassortant rotavirus vaccine for prevention of severe rotavirus gastroenteritis. *Lancet* 1997; 350:1205–1209.
- KALJOT KT, SHAW RD, RUBIN DH, GREENBERG HB. Infectious rotavirus enters cells by direct cell membrane penetration, not by endocytosis. *Journal of Virology* 1988; 62: 1136–1144.
- KAPIKIAN AZ, CHANOCK RM. Rotaviruses. *In*: Fields BN (Ed). *Virology*. New York: Raven Press, 1985; 863-906.

KAPIKIAN AZ, CHANOCK RM. Rotaviruses. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Monath TP, Melnick JL (Eds). *Virology*, 2nd edn. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1996; 1657-1708.

KAPIKIAN AZ, GREENBERG HB, WYATT RG. Viral gastroenteritis. In: AS Evans (ed). *Viral infections of humans*, 2nd ed. Plenum Publishing Corp., New York, 1982: 283-326.

KAPIKIAN AZ, HOSHINO Y, CHANOCK RM, PEREZ-SCHAEEL I. Efficacy of a quadrivalent rhesus rotavirus-based human rotavirus vaccine aimed at preventing severe rotavirus diarrhoea in infants and young children. *The Journal of Infectious Diseases* 1996; 174: S65–S72.

KAPIKIAN AZ, HOSHINO Y, CHANOCK RM. 2001. Rotaviruses. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, (Eds). *Field's virology*, 4rd edn. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2001; 1787 – 1833.

KAPIKIAN AZ, SIMONSEN L, VESIKARI T, HOSHINO Y, MORENS DM, CHANOCK RM, LA MONTAGNE JR, MURPHY BR. A hexavalent human rotavirus-bovine rotavirus (UK) reassortant vaccine designed for use in developing countries and delivered in a schedule with the potential to eliminate the risk of intussusception. *The Journal of Infectious Diseases* 2005; 192 Supplementum 1:S22-29.

HYPERLINK "http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6WXR-4MSHT5R-2&_user=10&_coverDate=01%2F09%2F2007&_rdoc=1&_fmt=&_orig=searCh&_sort=d&view=c&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=85c776ae89f7c80e1b2dc07f084f5744" KHAMRIN P, MANEEKARN N, PEERAKOME S, CHAN-IT W, YAGYU F, OKITSU S, USHIJIMA H. Novel porcine rotavirus of genotype P[27] shares new phylogenetic lineage with G2 porcine rotavirus strain. *Virology* 2007; [Epub ahead of print].

KOVACS A, CHAN L, HOTRAKITYA C, OVERTURF G, PORTNOY B. Rotavirus gastroenteritis: clinical and laboratory features and use of the rotazyme test. *American Journal of Diseases of Children* 1987; 141: 161-166.

LANATA CF, MIDTHUN K, BLACK RE, BUTRON B, HUAPAYA A, PENNY ME, VENTURA G, GIL A, JETT-GOHEEN M, DAVIDSON BL. Safety, immunogenicity and protective efficacy of one and three doses of the tetravalent rhesus rotavirus vaccine in infants in Lima. Peru *The Journal of Infectious Diseases* 1996; 174:268–275.

- LAWTON JA, ESTES MK, PRASAD BV. Three-dimensional visualization of mRNA release from actively transcribing rotavirus particles. *Nature Structural Biology* 1997; 4: 118-121.
- LINHARES REC, WIGG MD, LAGROTA MHC, NOZAWA CM. The *in vitro* antiviral activity of isoprinosine os simian rotavirus (SA-11). *Brazilian Journal of Medical Biology Research*, 1989; 22:1095-1103.
- LONIEN SCH, BOLOGNINI AM, LINHARES REC, NOZAWA, CM. The *in vitro* comparative cytopathology of a porcine rotavirus and the simian prototype (SA-11). *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*; 2001; 53:406-409.
- LUNDGREN O, SVENSSON L. Pathogenesis do rotavirus diarrhea. *Microbes and Infection* 2001; 3:1145-1156.
- MACKOW ER. Group B and C rotaviruses. In: Blaser MJ, Smith PD, Ravdin JI, et al., eds. *Infections of the Gastrointestinal Tract*. New York: Raven Press 1995; 983–1008.
- MALHERBE H, HARWIN R. The cytopathic effects of vervet monkey viruses. *South African Medical Journal* 1963; 37: 407-411.
- MALHERBE HH, STRICKLAND-CHOLMLEY M. Simian virus SA11 and the related O agent. *Archiv für die gesamte Virusforschung* 1967; 22: 235-245.
- MCCRAE MA, MCCORQUODALE JG. Molecular biology of rotaviruses. V. Terminal structure of viral RNA species. *Virology* 1983; 126: 204-212.
- MEBUS C, UNDERDAHL N, RHODES M, TWIEHAUS M. Calf diarrhea (scours): reproduced with a virus from a field outbreak. *Research Bulletin* 1969; 233: 1-16.
- MIDTHUN K, KAPIKIAN AZ. Rotavirus vaccines: an overview. *Clinical Microbiology Reviews* 1996; 9:423–434.
- NAKAGOMI O, NAKAGOMI T, AKATANI K, IKEGAMI N. Identification of rotavirus genogrupos by RNA-RNA hybridization. *Molecular and Cellular Probes* 1989, 3: 251-261.

NEWMAN RD, GRUPP-PHELAN J, SHAY DK, DAVIS RL. Perinatal risk factors for infant hospitalization with viral gastroenteritis. *Pediatrics* 1999; 103:3.

OFFIT PA. The rotavirus vaccine. *Journal of Clinical Virology* 1998;11(3):155-159. Review.

PARASHAR UD, HOLMAN RC, CUMMINGS KC, STAGGS NW, CURNS AT, ZIMMERMAN CM, KAUFMAN SF, LEWIS JE, VUGIA DJ, POWELL KE, GLASS RI. Trends in intussusception-associated hospitalizations and deaths among US infants. *Pediatrics* 2000, 106: 1413-1421.

PARASHAR UD, HUMMELMAN EG, BRESEE JS, MILLER MA, GLASS RI. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerging Infectious Diseases* 2003; 9: 565-572.

PARASHAR UD, ALEXANDER JP, GLASS RI, ADVISORY COMMITTEE ON IMMUNIZATION PRACTICES (ACIP), CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Prevention of rotavirus gastroenteritis among infants and children. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *Morbidity and Mortality Weekly Report* 2006; 55(RR-12):1-13.

PEREZ-SCHAEI I, GUNTTINAS MJ, PEREZ M, PAGONE V, ROJAS AM, GONZALEZ R, GONZALES R, CUNTO W, HOSHINO Y, KAPIKIAN AZ. Efficacy of the rhesus rotavirus-based quadrivalent vaccine in infants and young children in Venezuela. *The New England Journal of Medicine* 1997; 337:1181–1187.

PETRIE BL, GREENBERG HB, GRAHAM DY, ESTES MK. Ultra-structural localization of rotavirus antigens using colloidal gold. *Virus Research* 1984; 1: 133-152.

PINTO R, GAJARDO R, ABAD F, BOSCH A. Detection of fastidious infectious enteric viruses in water. *Environmental Science & Technology* 1995; 29:2636–2638.

RAMOS APD, STEFANELLI CS, LINHARES REC, BRITO BG, SANTOS N, GOUVEA V, LIMA RC, NOZAWA CM. The stability of porcine rotavirus in feces. *Veterinary Microbiology*, 2000; 71:1-8.

RENNELS MB, GLASS RI, DENNEHY PH, BERNSTEIN DI, PICHICHERO ME, ZITO ET, MACK ME, DAVIDSON BL, KAPIKIAN AZ. Safety and efficacy of high-dose rhesus-human reassortant rotavirus vaccines—reports of National Multicenter trial. United States Rotavirus Vaccine Efficacy Group. *Pediatrics* 1996; 97(1):7–13.

RIEPENHOFF-TALTY M, BOGGER-GOREN S, LI P, CARMODY PJ, BARRETT HJ, OGRA PL. Development of serum and intestinal antibody response to rotavirus after naturally acquired rotavirus infection in man. *Journal of Medical Virology* 1981; 8(3): 215-222.

ROVOZZO GC, BURKE CN. *A Manual of Basic Virological Techniques*. 1st Ed., Prentice Hall Inc. Englewood Cliffs, New Jersey 1973; Cap. 6, p.126-152.

RUGGERI FM, GREENBERG HB. Antibodies to the trypsin cleavage peptide VP8* neutralize rotavirus by inhibiting binding of virions to target cells in culture. *Journal of Virology* 1991; 65: 2211-2219.

SALINAS B, PEREZ SCHAEI I, LINHARES AC, RUIZ PALCAIOS GM, GUERRERO ML, YARZABAL JP, CERVANTES Y, COSTA CLEMENS S, DAMASO S, HARDT K, DE VOS B. Evaluation of safety, immunogenicity and efficacy of an attenuated rotavirus vaccine, RIX4414: a randomized, placebo-controlled trial in Latin American infants. *The Pediatric Infectious Disease Journal* 2005; 24: 807-816.

SANTOS NSO. *Viroses entéricas*. In: Santos NSO, Romanos MTV, Wigg, MD. *Introdução a virologia humana*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan 2002; 6: 59-74.

SANTOSHAM M, MOULTON LH, REID R, CROLL J, WEATHERHOLT R, WARD R, FORRO J, ZITO E, MACK M, BRENNEMAN G, DAVIDSON BL. Efficacy and safety of high-dose rhesus-human reassortant rotavirus vaccine in Native American populations. *The Journal of Pediatrics* 1997; 131(4): 632-638.

SCHMITZ J. Anti-rotavirus vaccinations. *Archives de Pédiatrie* 1999; 6:979–984.

SMITH E, ESTES M, GRAHAM D, GERBA C. A plaque assay for the simian rotavirus SA-11. *The Journal of General Virology* 1979; 43:513–519.

SMITH M, TZIPORI S. Gel electrophoresis of rotavirus RNA derived from six different animal species. *The Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science* 1979; 57(6): 583-585

TODD D, MCNULTY MS, ALLAN GM. Polyacrylamide gel electrophoresis of avian rotavirus RNA. *Archives of Virology* 1980; 63: 81-86.

UNICOMB LE, PODDER G, GENTSCH JR, WOODS PA, HASAN KZ, FARUQUE AS, ALBERT MJ, GLASS RI. Evidence of high-frequency genomic reassortment of group A rotavirus strains in Bangladesh: emergence of type G9 in 1995. *Journal of Clinical Microbiology* 1999; 37(6):1885-1891.

WARD R, KNOWLTON D, PIERCE M. Efficiency of human rotavirus propagation in cell culture. *Journal of Clinical Microbiology* 1984; 19:748–753.

WYATT R, JAMES W, BOHL E, THIEL K, SAIF L, KALICA A, GREENBERG H, KAPIKIAN A, CHANOCK R. Human rotavirus type 2: cultivation in vitro. *Science* 1980; 207:189–191.

YOLKEN R, WILDE J. Assays for detecting human rotavirus. In: Kapikian AZ, ed. *Viral infections of the gastrointestinal tract*. New York: Marcel Dekker, 1994: 251-278.

YOW MD, MELNICK JL, BLATTNER RJ, STEPHENSON WB, ROBINSON NM, BURKHARDT MA. The association of viruses and bacteria with infantile diarrhea. *American Journal of Epidemiology* 1970; 92: 33-39.

ZARATE S, ESPINOSA R, ROMERO P, MENDEZ E, ARIAS CF, LOPEZ S. The VP5 domain of VP4 can mediate attachment of rotaviruses to cells. *Journal of Virology* 2000; 74: 593-599.

APÊNDICES

Apêndice A
Isolation of Human Rotavirus in Cell Culture

Apendice A – Isolation of Human Rotavirus in Cell Culture.

Santos, A.C.S.; Benati, F.J.; Lauretti, F.; Minari, M.C.; Santos, N.; Linhares, R.E.C. & Nozawa, C.*.

Departamento de Microbiologia. Centro de Ciências Biológicas. UEL. Caixa Postal 6001. CEP 86051-970. Londrina, PR. Brasil.

1- Departamento de Virologia. IMPPG. UFRJ. Caixa Postal 68040. CEP 21944-970. Rio de Janeiro, RJ. Brasil.

*To whom correspondence should be adressed.

Prof. Carlos Nozawa
Departamento de Microbiologia. CCB. UEL.
Caixa Postal 6001.
CEP 86051-970.
Londrina, PR.
Brazil.

Phone: 55 433371 4617
e-mail: cnoz@uel.br

Abstract

Background: Rotaviruses are the single most important cause of severe diarrheal illness in infants and young children in both developed and developing countries worldwide, they affect mainly, children less than 24 months of age. The propagation of wild-virus strains in vitro allows a wide range of possibility since their use as a relevant tool, as well as, a model for both basic and applied virology.

Objectives: (1) To adapt human rotavirus strains in cell culture as well as to study their cytopathological properties. (2) To monitor adaptation by cytopathic effect, immunofluorescence assay, plaque assay and genome amplification.

Study design: The study was carried out with 53 rotavirus-positive fecal specimens submitted to at least 3 blind passages in MA-104 cell culture before discarded as non-cultivable. The adaptation process was monitored by the development of the cytopathic effect (CPE), immunofluorescence assay (IFA), plaque assay (PA) and genome amplification by RT-PCR.

Results: Fourteen human rotavirus strains were adapted to grow in cell culture. The evidence of the isolation was recognized by the observation of the development of typical CPE. IFA revealed specifically fluorescent granular inclusions mainly at the perinuclear area. PA allowed the demonstration of plaques with varying diameter depending upon the strains. RT-PCR resulted in genome amplification.

Keywords: rotavirus, isolation, cell culture

1. Introduction

Rotaviruses are relevant cause of severe diarrheal illness in children in both developed and developing countries worldwide, they affect mainly, children less than 24 months of age (KAPIKIAN *et al.*, 2001), however, affecting adults increasingly. Rotavirus gastroenteritis is responsible for approximately 45% of severe infection in infants and young children worldwide (PARASHAR *et al.*, 2000).

Rotaviruses are members of the family *Reoviridae* and are included in the genus *Rotavirus*. The 70 nm virion is non-enveloped, presents eleven segments of double-stranded RNA involved with a concentric triple-layered double-shelled capsid. Each RNA segment is monocistronic, except segment 11, which codifies two proteins. Six segments code for structural proteins (VP1-VP4[VP 5* + VP8*], VP6-VP7) and five code for nonstructural (NSP1-NSP5). The inner layer is composed by VP2, the intermediate layer by VP6 and the outermost layer by VP4 and VP7 (KAPIKIAN *et al.*, 2001).

The adaptation of wild-virus strain by the isolation and establishment in cell culture is of relevance in the basic and applied virology. Once this goal is attained, the evaluation of virus-cell interaction can be fulfilled as a model to better understand of viral infection under cytopathogenic ground as well as the virus biologic features. Therefore, in this work we proposed the isolation and adaptation of human strains of rotavirus from field samples in cell culture.

2. Materials and Methods

Specimens

Fifty three positive fecal samples were collected in the city of Ponta Grossa, Pr., during the period of May to August of 2003, and were maintained under refrigeration at the Departamento de Microbiologia. The stools were homogenized at 10% (v/v) in phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.3, with the aid of glass beads and clarified by centrifugation at 3000 xg for 10 min. The resulting supernatant fluids were treated with 200 UI/ml penicillin, 200 µg/ml estreptomycin and 10 µg/mL fungizone, and again centrifuged at 3000 xg for 20 min. The supernatant fluids were stocked at -20°C.

Virus isolation and detection

Seventy percent confluent MA-104 (monkey fetal kidney cell line) cell cultures were used and virus growth was followed by the development of CPE and confirmed with IFA. In both cases, simian rotavirus (SA-11) was used as positive control (RAMOS *et al.*, 2000).

Conventional technique was used for PA with minor modification, as described elsewhere (LONIEN *et al.*, 2001).

For multiplex RT-PCR, the viral RNA was extracted with RNAagents Total Isolation System kit (PRomega) and assayed with specific primers for G1-G4, G9, and G12, as previously described (DAS *et al.*, 1994).

3. Results

Fourteen human rotavirus strains identified as HC10, HL14, HC20, HC27, HC30, HL37, HL47, HC49, HC65, HL72, HL73, HL81, HC84 and HC116 were adapted to grow in MA-104 cells, with the observation of typical cytopathic effect (CPE). After approximately three blind passages, infected cell cultures developed CPE 48 h p.i. The earliest changes detected involved cell shrinkage and rounding, increase of cells with spindle-shaped cytoplasm, and this was followed by cell detachment from the monolayer. Maximum intensity of CPE was observed at approximately 96 h p.i., with complete involvement of the monolayer and cells detachment.

Cell cultures infected with adapted strains were submitted to IFA. Extensive cytoplasmic perinuclear fluorescence was observed in infected cells consisting of fluorescent granular inclusions typical of rotavirus infection (fig. 01).

Twelve isolated strains demonstrated the capacity to form plaques of irregular border (fig. 02). The strains (HC10, HL14, HC20, HC27, HC30, HL47, HC49, HC65, HL73, HC116) produced predominantly small plaques with an average of 0.07 mm in diameter, while the samples (HL37, HL72) produced predominantly large plaques with an average of 0,26 mm in diameter. Using PA adapted strains yielded titer varying from $0,5 \times 10^2$ to $0,1 \times 10^8$.

Genome of 9 adapted strains was submitted for VP7 amplification by multiplex RT-PCR and 8 were characterized as genotype G1.

4. Discussion & Conclusion

In this work we report the adaptation of human strains of rotavirus to grow in cell culture. MA-104 cell culture has been considered one of the best substratum for rotavirus adaptation and growth such as previously demonstrated (ESTES *et al.*, 1979; TAJIMA *et al.*, 1984; TAKASE *et al.*, 1986). However, primary cell cultures, as well as, other continuous cell lines have been used for serial passages of species of rotavirus, such as BS-C-1, AGMK, MDBK and PK (MALHERBE & STRICKLAND-CHOLMLEY, 1967; FERNELIUS *et al.*, 1972; BABIUK *et al.*, 1977; MCNULTY *et al.*, 1977; THEIL *et al.*, 1977; FUKUSHO *et al.*, 1981; GREENBERG *et al.*, 1981).

Although CPE of human strains was typical the confirmation of the isolation was carried out by IFA, useful for the detection of animal and human rotaviruses. IFA can be even more sensitive than the straightforward enzyme immune assay (GUTTMAN-BASS *et al.*, 1987).

The isolates were also capable to produce plaques in MA-104 cells with varied size in ratification of strain isolation and adaptation, as demonstrated elsewhere (MATSUNO *et al.*, 1977; ESTES & GRAHAM, 1980; OFFIT *et al.*, 1983; GREENBERG *et al.*, 1986; PATTON *et al.*, 2001; WESTERMAN *et al.*, 2006).

Using the RT-PCR approach we also demonstrated that cell culture adapted human strains allowed amplification and that G1 genotype was ratified in agreement with previously results performed in original field samples (PIETRUCHINSKI, 2006).

In conclusion, we demonstrated the successful cultivation of human rotavirus strains in cell culture. This result may allow the establishment of models for the study of biological characteristics of virus strains in view of several practical approach.

References

Babiuk LA, Mohammed K, Spence L, Fauvel M, Petro R. Rotavirus isolation and cultivation in the presence of trypsin. *J Clin Microbiol* 1977; 6:610-7.

Das BK, Gentsch JR, Cicirello HG, Woods PA, Grupta A, Ramachandran M, Kumar R, Bhan MK, Glass RI. Characterization of rotavirus strains from newborns in New Delhi, India. *J Clin Microbiol* 1994; 32:1820-22.

Estes MK, Graham DY, Gerba CP, Smith EM. Simian rotavirus SA11 replication in cell cultures. *J Virol* 1979; 31(3):810-5.

Estes MK, Graham DY. Identification of rotaviruses of different origins by the plaque-reduction test. *Am J Vet Res* 1980; 41:151-2.

Fernelius AL, Ritchie AE, Classick LG, Norman JO, Mebus CA. Cell culture adaptation and propagation of a reovirus-like agent of calf diarrhea from a field outbreak in Nebraska. *Arch Gesamte Virusforsch* 1972; 37:114-30.

Fukusho A, Shimizu Y, Ito Y. Isolation of cytopathic porcine rotavirus in cell roller culture in the presence of trypsin. *Arch Virol* 1981; 69:49-60.

Greenberg HB, Kalica AR, Wyatt RG, Jones RW, Kapikian AZ, Chanock RM. Rescue of noncultivable human rotavirus by gene reassortant during mixed infection with ts mutants of a cultivatable bovine rotavirus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78:420-24.

Greenberg HB, Vo PT, Jones R. Cultivation and Characterization of Three Strains of Murine Rotavirus. *J Virol* 1986; 57(2):585-90.

Guttman-Bass N, Tchorsh Y, Marva E. Comparison of methods for rotavirus detection in water and results of a survey of Jerusalem Wastewater. *Appl Environ Microbiol* 1987; 53(4):761-7.

Kapikian AZ, Hoshino Y, Chanock RM. Rotaviruses. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, editors. *Field's Virology*, 4rd edition, Lippincott Williams e Wilkins Co, Philadelphia, 2001;1787 – 833.

Lonien SCH, Bolognini AM, Linhares REC, Nozawa, CM. The *in vitro* comparative cytopathology of a porcine rotavirus and the simian prototype (SA-11). *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*; 2001; 53:406-9.

Malherbe HH, Strickland-Cholmley M. Simian virus SA11 and the related O agent. *Arch Virol* 1967; 22:235-45.

Matsuno S, Ynouye S, Kono R. Plaque assay of neonatal calf diarrhea virus and the neutralizing antibody in human sera. *J Clin Microbiol* 1977; 5:1-4.

McNulty MS, Allan GM, McFerran JB. Cell culture studies with a cytopathic bovine rotavirus. *Arch Virol* 1977; 54:201-9.

Offit PA, Clark HF, Plotkin SA. Response of mice to rotaviruses of bovine or primate origin assessed by radioimmunoassay, radioimmunoprecipitation, and plaque reduction neutralization. *Infect Immun* 1983; 42(1):293-300.

Parashar UD, Holman RC, Cummings KC, Staggs NW, Curns AT, Zimmerman CM, Kaufman SF, Lewis JE, Vugia DJ, Powell KE, Glass RI. Trends in intussusception-associated hospitalizations and deaths among US infants. *Pediatrics* 2000; 106:1413-21.

Patton JT, Taraporewala Z, Chen D, Chizhikov V, Jones M, Elhelu A, Collins M, Kearney K, Wagner M, Hoshino Y, Gouvea V. Effect of intragenic rearrangement and changes in the 3' consensus sequence on NSP1 expression and rotavirus replication. *J Virol* 2001; 75(5):2076-86.

Pietruchinski E, Benati F, Lauretti F, Kisielius J, Ueda M, Volotao EM, Soares CC, Hoshino Y, Linhares RE, Nozawa C, Santos N. Rotavirus diarrhea in children and adults in a southern city of Brazil in 2003: distribution of G/P types and finding of a rare G12 strain. *J Med Virol* 2006; 78(9):1241-49.

Ramos APD, Stefanelli CS, Linhares REC, Brito BG, Santos N, Gouvea V, Lima RC, Nozawa CM. The stability of porcine rotavirus in feces. *Vet Microbiol*, 2000; 71:1-8.

Tajima T, Suzuki E, Ushijima H, Araki K, Kim B, Shinozaki T, Fujii R. Isolation of murine rotavirus in cell cultures. *Arch Virol* 1984; 82:119-23.

Takase K, Nonaka F, Sakaguchi M, Yamada S. Cytopathic avian rotavirus isolated from duck faeces in chicken cell cultures. *Avian Pathol* 1986; 15:719-30.

Theil KW, Bohl EH, Agnes AG. Cell culture propagation of porcine rotavirus (reovirus-like agent). *Am J Vet Res* 1977; 38:1765-8.

Westerman LE, Jiang B, McClure HM, Snipes-Magaldi LJ, Griffin DD, Shin G, Gentsch JR, Glass RI. Isolation and characterization of a new simian rotavirus, YK-1. *Virology* 2006; 344:1-10.



Fig. 01 – MA-104 cell culture infected with strain HC49 and submitted to immunofluorescence assay, 48 h pós-infection (400X).

A B C D E F

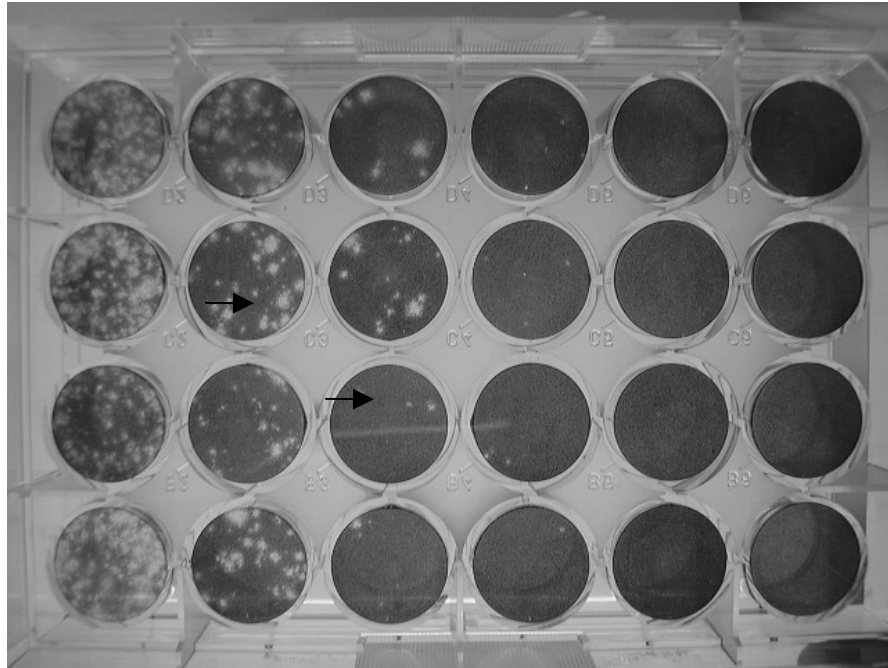


Fig. 02 - Stained MA-104 cell culture infected with strain HC49, diluted from 10^{-1} to 10^{-5} (lines A to E, respectively), 72 h post-infection. Line F: noninfected cell control. Arrows indicate large and small plaques.

ANEXOS

Anexo 1
Soluções

Anexo 1 – Soluções

1. Meio de cultura de célula

Meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) pH 7,4	13,4 g
Água tridestilada q.s.p	1000 ml

Antes da filtração esterilizante em membrana filtrante de 0,22 µm, o pH do meio foi ajustado a 7,4 com solução de hidróxido de sódio a 1 N.

2. Solução de NaHCO₃ a 7,5%

NaHCO ₃	7,5 g
Água destilada e deionizada q.s.p	100 ml

3. Solução de tripsina a 0,25% e verseno a 0,025%

Verseno	0,025 g
Tripsina (1:200)	0,25 g
Vermelho de Fenol a 0,5%	0,5 ml
Tampão fosfato-salina pH 7,3 q.s.p	1000 ml

Antes da filtração esterilizante em membrana filtrante de 0,22 µm, o pH da solução foi ajustado a 7,3 com solução de hidróxido de sódio a 1 N.

4. Solução de vermelho de fenol a 0,5%

Vermelho de fenol	0,5 g
Água bidestilada e deionizada q.s.p	100 ml

5. Solução de glutamina a 3%

Glutamina	12 g
Água bidestilada e deionizada q.s.p	400 ml

Esterilizar por filtração em membrana de nitrocelulose de 0,22 µm, aliquotar e manter a -20°C. Usar 1 ml para cada 100 ml de meio de cultura.

6. Solução de Antibióticos

6.1 Penicilina potássica cristalina

Penicilina potássica cristalina	10.000.000 UI
---------------------------------	---------------

Água destilada e deionizada estéril q.s.p	500 ml
---	--------

6.2 Sulfato de estreptomicina

Sulfato de estreptomicina	1 g
Água destilada e deionizada estéril q.s.p	50 ml

Misturar a solução de penicilina cristalina e estreptomicina (v/v), esterilizar por filtração em membrana de nitrocelulose de 0,22 μ m, aliquotar e manter a -20°C. Desta mistura usar 1 ml para cada 100 ml de meio de cultura.

7. Anfotericina B (fungizona)

Anfotericina B	5 mg
Água destilada e deionizada estéril q.s.p	20 ml

Esterilizar por filtração em membrana de nitrocelulose de 0,22 μ m, aliquotar e manter a -20°C. Usar 1 ml para cada 100 ml de meio de cultura.

8. Tampão fosfato-salina (PBS), pH 7,3

Cloreto de sódio	8,0 g
Fosfato dibásico de sódio	0,91 g
Fosfato monobásico de potássio	0,12 g
Cloreto de potássio	0,20 g
Água destilada q.s.p	1000 ml

Ajustar o pH com Ácido clorídrico 1N e esterilizar por autoclavação a 120°C por 15 min.

9. Tripsina cristalina (Estoque)

Tripsina cristalina	1 mg
PBS, pH 7,3 q.s.p	100 ml

Esterilizar por filtração em membrana de nitrocelulose (0,2 μ m) e estocar a -20°C.

10. Solução de Glicerina Tamponada a 50%, pH 7,3

Glicerol	10 ml
PBS, pH 7,3 q.s.p	20 ml

11. Solução tampão de tris-HCl pH 7,3 adicionado de Cloreto de Cálcio (10 vezes concentrado)

Tris hidroximetilaminometano	12,1 g
Cloreto de cálcio	2,2 g
Água deionizada q.s.p.	1000 ml

Ajustar para pH 7,3 com HCl concentrado antes de completar o volume final do tampão. Autoclavar a 120°C por 20 min. Conservar a 4°C.

12. Mistura fenol/clorofórmio (V/V)

Fenol bidestilado	50 ml
Clorofórmio	50 ml

A mistura foi homogeneizada, saturada com tampão Tris/HCl/Ca⁺⁺ pH 7,3 e conservada a -20°C.

13. Solução D (isotiocianato de guanidina)

Isotiocianato de guanidina	70,92g
Citrato de sódio (pH-7)	1,1g
Sarcosil	0,75g
2-mercaptoetanol	1,04 ml
Água destilada q.s.p.	100 ml

14. Acetato de sódio

Acetato de sódio	0,54g
Água destilada q.s.p.	100 ml

15. SDS 0,5%

SDS 0,5	3 ml
Azul de bromofenol a 1%	0,1 ml
Glicerol	1 ml
Água destilada q.s.p.	10 ml

16. Dietilpirocarbonato (DEP-C)

DEP-C	1 ml
-------	------

Água destilada q.s.p. 1000 ml

17. Soluções para EGPA

17.1 Solução A (50% acrilamida; 1,3 tetra-metilenobisacrilamida)

Acrilamida 50 g

1,3 tetra-metilenobisacrilamida 1,3 g

Água destilada q.s.p. 100 ml

17.2 Solução B (tampão para gel separador) [4x] 3,5M Tris/HCl; pH8,8

Tris-hidroximetilaminometano 18,17 g

Água destilada q.s.p. 100 ml

Ajustar para pH 8,8 com HCl 12N.

17.3 Solução C (tampão para gel concentrador) [4x] 0,5 M Tris/HCl; **pH6,8**

Tris-hidroximetilaminometano 6,06 g

Água destilada q.s.p. 100 ml

Ajustar para pH 6,8 com HCl 12N.

17.4 Persulfato de amônio a 2%

Persulfato de amônio 200 mg

Água destilada q.s.p. 10 ml

Preparar a solução, aliquotar e manter a -20°C.

17.5 Tampão para reservatório [4x] concentrado (0,1 M tri; 0,83 M Glicina, pH 8,3)

Tris-hidroximetilenoaminometano 12 g

Glicina 56,6 g

Água destilada q.s.p. 1000 ml

Ajustar para pH 8,3 com HCl 12N.

17.6 Solução de tampão dissociante (0,0625 Tris/HCl, pH 6,8; 5M uréia; 5% de 2-mercaptoetanol; 3% de duodecilsulfato de sódio; 0,01% de azul de bromofenol; 10% de glicerol).

Uréia 3 g

2-mercaptoetanol	0,50 ml
SDS a 10%	3 ml
Tris-HCl 0,5M pH 6,8 (sol.C)	1,25 ml
Azul de bromofenol a 1%	0,10 ml
Glicerol	1 ml
Água destilada q.s.p.	10 ml

18. Soluções para ensaio de plaque

18.1 Meio 2X concentrado

Meio DMEM	3,4 g
Bicarbonato de sódio	40 ml
Água bidestilada e deionizada q.s.p.	500 ml

Antes da filtração esterilizante em membrana filtrante de 0,22 µm, o pH do meio foi ajustado a 7,4.

18.2 Agarose 1,5%

Agarose	1,50 g
Água bidestilada e deionizada q.s.p.	100 ml

Preparar solução em temperatura elevada (acima de 46°C), facilitando a dissolução. Aliquotar e autoclavar (15 min/121°C).

18.3 Formaldeído 10% (PBS)

Formaldeído	10 ml
PBS q.s.p.	1000 ml

18.4 Solução alcoólica de cristal violeta a 0,5%

Cristal Violeta	0,5 g
Formalina a 1%	5 ml
Etanol a 20% q.s.p	100 ml

Dissolver o cristal violeta na solução alcoólica e adicionar ao final a formalina. Manter a solução em frasco escuro.

Anexo 2
Reagentes

Anexo 2 – Reagentes

2-Mercaptoetanol, P.A.	Merck
Acetona	Merck
Ácido acético glacial, P.A	Synth
Acrilamida	Sigma
Agarose tipo V	Sigma
Anfotericina B	Bristol Meyers Squibb
Azul de bromofenol, P.A.	Reagen
Bicarbonato de sódio	Synth
Bisacrilamida	Sigma
Cloreto de potássio, P.A.	Reagen
Cloreto de sódio, P.A.	Reagen
Cristal violeta	Nuclear
Duodecilsulfato de sódio	Merck
Ácido etileno diaminotetracético (E.D.T.A)	Sigma
Etanol absoluto, P.A.	Merck
Formaldeído	Bioquímica
Fosfato dibásico de sódio, P.A.	Vetec
Fosfato Monobásico de potássio anidro, P.A.	J.T.Baker
Fosfato monobásico de sódio, H ₂ O, P.A.	Riedel
Glicerol, P.A.	Reagen
Glicina	Synth
Hidróxido de sódio	Merck
Kit <i>RNAgents Total Isolation System</i>	PRomega
L-Glutamina	Sigma
Meio Dulbecco Modificado por Eagle (DMEM)	Gibco
Membrana Filtrante 0,22 µm	MFS
Metanol, P.A.	Merck
Nitrato de prata	Merck
N-N-N-N-tetrametilenodiamino (TEMED)	Merck
Penicilina G potássica	Sigma
Persulfato de amônio, P.A.	Merck
Soro de coelho anti IgG de camundongo conjugado com FITC	Sigma

Soro fetal bovino	Gibco BRL
Sulfato de estreptomicina	Sigma
Tripsina 1:250	Reagen
Tripsina cristalina	Gibco
Tris hidroximetinometano, P.A.	Riedel
Uréia, P.A.	Quimis
Vermelho de fenol	Sigma