



**UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA**

GUSTAVO FRANTHESCO KERNTOPF

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ROTAVÍRUS
HUMANOS EM PACIENTES HOSPITALIZADOS DE PONTA
GROSSA, LONDRINA E ASSAÍ – PR**

Londrina
2009

GUSTAVO FRANTHESCO KERNTOPF

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ROTAVÍRUS
HUMANOS EM PACIENTES HOSPITALIZADOS DE PONTA
GROSSA, LONDRINA E ASSAÍ – PR**

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

Orientador: Prof. Carlos Nozawa.

Londrina
2009

**Catálogo na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

K39d Kerntopf, Gustavo Franchesco.
Detecção e caracterização de cepas de rotavírus humanos em pacientes hospitalizados de Ponta Grossa, Londrina e Assai – PR / Gustavo Franchesco Kerntopf. – Londrina, 2009.
xiii, 55 f. : il.

Orientador: Carlos Mitihiko Nozawa.
Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2009.
Inclui bibliografia.

1. Rotavírus – Teses. 2. Diarréia – Teses. 3. Viroses – Teses. I. Nozawa, Carlos Mitihiko. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

CDU 578

GUSTAVO FRANTHESCO KERNTOPF

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ROTAVÍRUS
HUMANOS EM PACIENTES HOSPITALIZADOS DE PONTA
GROSSA, LONDRINA E ASSAÍ – PR**

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

BANCA EXAMINADORA

Prof. Marco Antonio Nogueira

Dr. Laerte Francisco Filippesen

Prof. Carlos Nozawa

Londrina, 21 de setembro de 2009.

“Sei que existe uma lei perfeita de oferta e demanda. Meus motivos são certos, e sempre desejo fazer o que é certo no momento certo. Estou instantaneamente em contato com tudo aquilo de que preciso. Encontro-me, agora, em meu verdadeiro lugar; estou exercitando meus talentos de modo maravilhoso e tenho a bênção divina. A Inteligência Infinita guia agora meus pensamentos, minhas palavras e ações, e tudo o que realizo é controlado por Deus, e por Deus apenas. Sou um perfeito canal de Deus. Sinto e sei que meu Deus Próprio ilumina meu caminho e creio nisso. A Inteligência Divina inspira, dirige e governa todos os meus empreendimentos e instantaneamente me revela a resposta para tudo o que preciso saber. O Amor Divino me precede, transformando todos os caminhos numa senda de paz, amor, alegria e felicidade. É maravilhoso!”

*Joseph Murphy, O Poder Cósmico da Mente
Oração pela Orientação Divina*

AGRADECIMENTOS

Sobretudo, agradeço à dádiva divina da busca pelo saber.

Ao Professor Carlos M. Nozawa pelos conhecimentos compartilhados e paciência, os quais foram fundamentais no decorrer do projeto e serviram de base para a formação na área.

À Professora Rosa Elisa Carvalho Linhares cuja simpatia, competência e motivação serviram de estímulo para o avanço deste projeto.

Aos professores que participaram na formação em Microbiologia: Célia G. T. J. Andrade, Galdino A. Filho, Halha O. Saridakis, Jacinta S. Pelayo, Márcia C. Furlaneto, Marco A. Nogueira, Maria Helena Fúngaro, Sueli F. Y. Ogatta; agradeço pelos ensinamentos compartilhados.

A todos os profissionais do Departamento de Microbiologia e do Centro de Ciências Biológicas que viabilizaram a execução do projeto.

Ao apoio técnico de Valdelice, Jussevânia, Osvaldo e Kerlei, sem o qual teria sido muito difícil concluir o projeto.

Aos amigos de Laboratório de Virologia: Airton Martins Jr., Ana Letícia Bernardi, Alessandra dos Santos, Daniele Albuquerque, Erika Szernisz, Flávio Lauretti, Kristie Yamamoto, Vinicius Rincão, Professoras Ana Paula Ramos e Lígia Galhardi, e aos alunos de iniciação científica júnior: Diego, José Felipe, Priscila e Weslei; agradeço pela convivência harmoniosa essencial para o bom desenvolvimento do trabalho.

À prof^a Norma Santos e doutorando Fabrício Benati do Laboratório de Vírus Respiratórias, Entéricas e Oculares da Universidade Federal do Rio de Janeiro, cuja solidariedade e conhecimentos disponíveis foram decisivos para o término do trabalho.

Aos pilares que sustentam minha existência, Euclides Kerntopf, Helena Batista de Souza Kerntopf e Danielle Giovanna Kerntopf, o meu mais sincero agradecimento pelos esforços e incentivos gerados durante mais esta etapa.

A todos meus amigos que, direta ou indiretamente, colaboraram para a concretização desse sonho. Agradeço pelo incentivo e estímulo para que não esmorecesse diante dos obstáculos.

Aos amigos da Associação Água Pura e Sukyo Mahikari pela inestimável ajuda através do direcionamento e orientação espiritual imprescindível para a conclusão deste trabalho.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação Araucária e à Pro-reitoria de Pesquisa e Pós-graduação da UEL pelo apoio financeiro.

KERNTOPF, Gustavo F. **Detecção e caracterização de rotavírus humanos em resposta a: pacientes hospitalizados de Ponta Grossa, Londrina e Assaí – PR.** 2009. 66f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

RESUMO

A diarreia aguda infantil continua sendo um dos grandes problemas de saúde pública mundial e representa um considerável prejuízo por todas as consequências direta e indireta da doença. No presente trabalho, avaliamos a participação do rotavírus em casos de diarreia aguda em pacientes residentes em Ponta Grossa, Londrina e Assaí, Paraná. O estudo envolveu a análise de 124 amostras fecais de pacientes acometidos da doença, desde indivíduos com um mês de idade até adultos com 81 anos. Os seguintes métodos foram usados: reação de aglutinação do látex (AL); reação de imunocromatografia (ICG); eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) do RNA viral; microscopia eletrônica (ME) por contraste negativo e genotipagem para os determinantes de proteínas virais estruturais (VP7 e VP4) e não estrutural (NSP4), através da reação de RT-PCR-ELISA e RT-PCR, respectivamente. Das 124 amostras fecais analisadas, 69 foram positivas para RV por pelo menos uma das técnicas usadas, das quais 63 foram consideradas como sendo RV do grupo A (RV-A), conforme demonstrado pelas técnicas sorológicas de ICG ou AL. Quatro outras cepas foram também consideradas como sendo RV-A, de acordo com o perfil eletroforético pela EGPA. Adicionalmente, a EGPA demonstrou que do total de 47 amostras positivas, 26 apresentaram padrão eletroforético curto, 20 apresentaram padrão longo e uma amostra apresentou padrão indeterminado. Pela microscopia eletrônica (ME), 11 amostras foram positivas das 47 amostras analisadas. A genotipagem de VP4/VP7 e da NSP4 foi realizada, respectivamente, por RT-PCR-ELISA e RT-PCR. A análise demonstrou que, das 124 amostras fecais testadas, houve uma amplificação total em 44 amostras. Onze amostras amplificaram individualmente para NSP4-A (6) ou NSP4-B (5). Treze amplificaram para as dupla-combinações G1/NSP4-B (2), G1P[8] (1), G2/NSP4-A (1), P[4]/NSP4-A (6), ou P[8]/NSP4-B (3) e 20 amplificaram para as tripla-combinações G1P[8]/NSP4-B (6), G2P[4]/NSP4-A (12) ou G9P[8]/NSP4B (2). Com relação a idade dos pacientes, 44 amostras positivas foram detectadas em crianças até cinco anos de idade; 12 em crianças entre seis a 11 anos; três em indivíduos entre 12 e 18 anos e 10 em pacientes com 19 anos ou acima.

Palavras-chave: Rotavírus. Diarreia. Víruses.

KERNTOPF, Gustavo F. **Detecção e caracterização de rotavírus humanos em resposta a: pacientes hospitalizados de Ponta Grossa, Londrina e Assaí – PR.** 2009. 66f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

ABSTRACT

The acute diarrheal disease is still one of the major public health problems worldwide. Presently, we evaluated the participation of RV in patients suffering from acute diarrhea from the cities of Ponta Grossa, Londrina and Assaí - Parana. Due to the increasing number of the infection by RV in adults, some of these patients were also included in this study. The study was performed with 124 stools samples from patients aged from one month old to 81 years of age suffering from the disease. The following tests were used: latex agglutination test (LA); immunochromatography (ICG); virus RNA polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE); negative staining electron microscopy (ME) and the genotyping of the structural virus proteins (VP4 and VP7) and nonstructural protein (NSP4) by RT-PCR-ELISA and RT-PCR, respectively. Out of 124 fecal samples, 69 were positive for RV by at least one of the tests used. Amongst them, 63 belonged to group A (RV-A) as demonstrated by the serological tests of ICG ou LA. Four additional strains were also assigned to RV-A by the electrophoretic pattern of the virus RNA by PAGE. In addition, PAGE demonstrated that from a total of 47 strains, 26 presented short electrophoretic pattern; 20 presented long pattern and one strain could not be determinated. By EM, 11 samples were positive out of 47. Genotyping (VP4 and VP7) and genogrouping (NSP4) were performed, respectively, by RT-PCR-ELISA and RT-PCR. The analysis demonstrated that out of 124 fecal samples tested there were a total amplification in 44 samples. Eleven samples amplified individually for NSP4-A (n=6) ou NSP4-B (n=5). Thirteen amplified for double-combinations G1/NSP4-B (n=2), G1P[8] (n=1), G2/NSP4-A (n=1), P[4]/NSP4-A (n=6), or P[8]/NSP4-B (n=3) and 20 amplified for the triple-combinations G1P[8]/NSP4-B (n=6), G2P[4]/NSP4-A (n=12) or G9P[8]/NSP4B (n=2). When the performance of the diagnostic tests was compared, we observed that eight samples were positive by two tests, 30 samples were positive by three tests, and nine samples were positive by four tests. Four samples were negative by all the five tests used. As far as the age of the 124 patients was concerned, 44 positive samples were detected in children up to five years of age; 12 positive samples in children from six to 11 years of age; three positive samples in patients from 12 to 18 years of age and 10 in patients from 19 years of age or above.

Keywords: Diarrhea. Virus diseases.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Taxa de mortalidade por rotavirose, no mundo, em crianças abaixo de cinco anos	12
Figura 2 – Micrografia eletrônica de partículas de rotavírus humanos, da amostra PGR05/042, em contraste negativo. Barra: 100 nm	14
Figura 3 – Representação esquemática da partícula de rotavírus	15
Figura 4 – Diagrama do perfil eletroforético dos segmentos de rna de rotavírus (grupo A-G)	20
Figura 5 – Ciclo de replicação do rotavírus	22

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Constituição molecular e principais funções das proteínas virais (protótipo SA-11)	17
Table 1 – VP7, VP4 and NSP4 primers used for amplification and genotyping.....	39
Table 2 – Distribution of rotavirus positive cases according to the age of the patient.....	41
Table 3 – Rotavirus strains detected with the respective methods of detection	41

LISTA DE ABREVIACÕES

1. **DLP:** *double-layered particle* (partícula de dupla camada)
2. **EDIM:** *Epizootic Diarrhea of Infant Mice*
3. **EDTA:** ácido etilendiamino tetra-acético
4. **EGPA:** eletroforese em gel de poliacrilamida
5. **EGTA:** ácido etilenoglicol tetra-acético
6. **ICG:** imunocromatografia
7. **RIE:** reação imunoenzimática
8. **AL:** aglutinação do látex
9. **E-tipo:** eletroferotipos
10. **ICTV:** *International Committee on Taxonomy of Viruses* (Comitê Internacional de Taxonomia Viral)
11. **ME:** microscopia eletrônica
12. **NCDV:** *Nebraska Calf Diarrhea Virus*
13. **NSP:** *non-structural protein* (proteína não estrutural)
14. **NTPase:** *nucleoside triphosphatase* (nucleosil trifosfato hidrolase)
15. **pb:** pares de bases
16. **RER:** retículo endoplasmático rugoso
17. **RNAdf:** ácido ribonucléico dupla-fita
18. **RNAsf:** ácido ribonucléico simples-fita
19. **RpRd:** RNA polimerase dependente de RNA
20. **RT-PCR:** reação em cadeia da polimerase associada à transcrição reversa
21. **RV:** Rotavírus
22. **SA-11:** *Simian Agent* (rotavírus símio)
23. **SG:** subgrupos
24. **SLP:** *single-layered particle* (partícula de simples camada)
25. **TLP:** *triple-layered particle* (partícula de tripla camada)
26. **VP:** *viral protein* (proteína viral, proteína estrutural)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 PROPRIEDADES GERAIS DOS VÍRUS	15
2.1 CARACTERÍSTICAS GENÔMICAS	18
2.2 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS	18
3 CLASSIFICAÇÃO	19
4 CICLO DE REPLICAÇÃO	21
5 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL	23
6 PATOGENIA, IMUNIDADE E EPIDEMIOLOGIA	24
7 VACINA E PREVENÇÃO	26
8 OBJETIVOS	27
8.1 OBJETIVO GERAL.....	27
8.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
REFERÊNCIAS	28
ARTIGO	34
APÊNDICES	50
APÊNDICE I.....	51
APÊNDICE II.....	60

1 INTRODUÇÃO

A doença diarréica aguda ainda é um dos grandes problemas de saúde pública no mundo, sendo uma das principais causas de morbidade e mortalidade principalmente entre crianças e jovens. As complicações ocorrem devido à desidratação e ao desequilíbrio hidroeletrólítico. Os rotavírus (RV) são importantes agentes causadores de diarréia aguda na saúde humana e animal. Pertencem ao gênero de mesmo nome (*Rotavirus*), da família *Reoviridae* e cujos vírions são icosaédricos, não envelopados e apresentam três camadas protéicas que cercam os 11 segmentos de RNA dupla-fita (RNAdf) (ESTES; COHEN, 1989).

Prejuízos econômicos significativos são estimados devido a doenças. Anualmente, são estimadas 600.000 mortes de crianças de até cinco anos, principalmente em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento. Mesmo nos países desenvolvidos, onde as condições de saneamento e higiene são satisfatórias, os RV são responsáveis por milhares de hospitalizações e óbitos (figura 1).

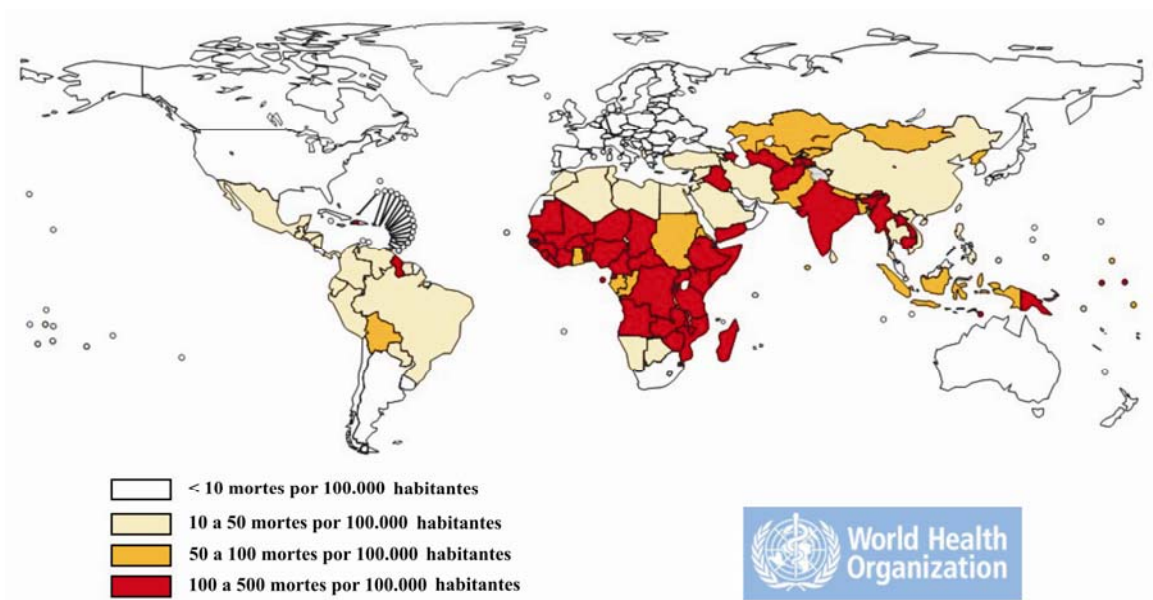


Figura 1 – Taxa de mortalidade por rotavirose, no mundo, em crianças abaixo de cinco anos (<http://www.who.int/nuvi/rotavirus/en/>).

A transmissão ocorre pela via orofecal, através de alimentos, bebidas ou objetos contaminados. Evidências sugerem que a rotavirose está associada com viremia e podem causar infecções extraintestinais (BLUTT *et al.*, 2007). Náusea, vômitos, febre, dores abdominais, mal estar e desidratação são as principais manifestações clínicas (KAPIKIAN *et al.*, 2001). O período de maior excreção viral dá-se entre o 3º e 4º dia a partir dos primeiros sintomas. No entanto, os vírions podem ser detectados nas fezes de pacientes mesmo após o período diarréico.

Os primeiros relatos de casos de diarréia aguda não bacteriana foram atribuídos a Light e Hodes (1943) ao descreverem a presença de um possível agente filtrável semelhante ao causador de diarréia em bezerros em pacientes hospitalizados em Baltimore, nos Estados Unidos da América.

Adams e Kraft (1963) observaram partículas virais em biópsia intestinal de camundongos jovens com diarréia e denominaram-nas de EDIM (*Epizootic Diarrhea of Infant Mice*). Malherbe *et al.* (1963) adaptaram um vírus em cultura de células a partir de suabe retal de macacos vervet saudáveis e nomearam-no de SA (*Simian Agent*). Malherbe e Strickland-Cholmley (1967) descreveram um vírus semelhante a partir de lavado intestinal de carneiro, isolado em células de rim de macaco, denominado Agente O (*Offal*). A partir de material fecal de bezerros com diarréia, Mebus *et al.* (1969) também relataram o isolamento de um vírus por eles denominados de NCDV (Nebraska Calf Diarrhea Virus).

Concomitantemente, Bishop *et al.* (1973) e Flewett *et al.* (1973), respectivamente, na Austrália e Reino Unido, demonstraram partículas virais semelhantes, em biópsia duodenal e em fezes de crianças através de microscopia eletrônica (ME). O referido agente foi denominado, posteriormente, de acordo com a sua estrutura ao microscópio eletrônico (figura 2), de rotavírus (FLEWETT *et al.*, 1974). No Brasil, o primeiro relato ocorreu por volta de 1976, em crianças hospitalizadas com diarréia, em Belém-PA (LINHARES *et al.*, 1977).

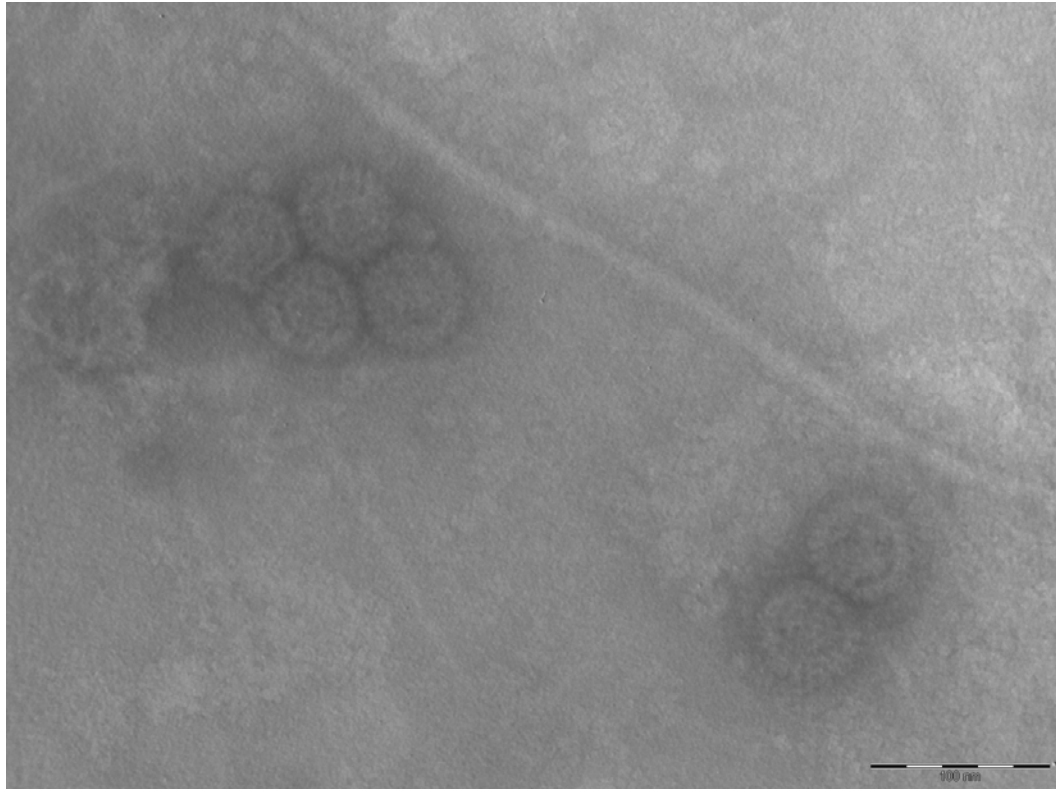


Figura 2 – Micrografia eletrônica de partículas de rotavírus humanos, da amostra PGR05/042, em contraste negativo. Barra: 100 nm.

Várias denominações de caráter abrangente foram atribuídas aos RV, tais como: orbivírus (BISHOP *et al.*, 1973); reovírus-like (KAPIKIAN *et al.*, 1974); duovírus (DAVIDSON *et al.*, 1975) e rotavírus (FLEWETT *et al.*, 1974). Em 1979, o Comitê Internacional de Taxonomia Viral (ICTV) oficializou a denominação rotavírus. Por extensão, o gênero recebeu o mesmo nome, incluído na família *Reoviridae*, devido a sua semelhança a uma roda (em Latim “rota”) quando observado ao ME (MATTHEWS, 1979).

Nos anos de 1980, pela primeira vez, cepas provenientes de humanos foram cultivadas em células de rim de macaco na presença de tripsina (URASAWA *et al.*, 1981).

A primeira vacina humana contra o RV foi licenciada em 1998, nos Estados Unidos da América. Tratava-se de uma vacina oral atenuada tetravalente híbrida, símio e humano, denominada de RotaShield. Essa vacina foi suspensa em 1999, devido ao aumento de casos de intussuscepção (invaginação de um segmento do intestino dentro de outro). Atualmente, duas vacinas estão sendo empregadas, a Rotarix, da Glaxo Smith-Kline Biologicals e RotaTeq, da Merck. Em 2006 a vacina Rotarix foi incluída no calendário brasileiro de vacinação.

2 PROPRIEDADES GERAIS DOS VÍRUS

Como mencionado anteriormente, os RV pertencem à família *Reoviridae* e estão contidos no gênero *Rotavirus*. O gênero é formado por cinco espécies (referido também como grupos) (RV-A a RV-E) e outras duas espécies provisórias (RV-F e RV-G) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/fs_reovi.htm#Type03). Os vírions são esféricos, não envelopados e apresentam três camadas concêntricas de proteínas: externa, intermediária e interna. Exibe o nucleocapsídeo icosaédrico que contém o genoma formado por 11 segmentos lineares de RNA de fita dupla e duas enzimas (fig. 3) (ESTES; COHEN, 1989; JAYARAM *et al.*, 2004).

À ME, as partículas virais podem se apresentar sob diferentes formas: a) a partícula íntegra, com tripla camada protéica (TLP), de aproximadamente 100 nm, de elevada capacidade infecciosa; b) partícula de dupla-camada (DLP), com diâmetro aproximado de 705 Å e c) partícula de simples-camada (SLP), pouco frequente e não infecciosa, com tamanho aproximado de 260 Å (ESTES; COHEN, 1989; BAKER *et al.*, 1999; JAYARAM *et al.*, 2004).

Os vírions apresentam 132 canais que se estendem do nucleocapsídeo ao capsídeo externo e estão envolvidos tanto no influxo dos metabólitos para a transcrição do genoma quanto no efluxo dos RNAs transcritos para subsequente replicação (KAPIKIAN *et al.*, 2001; ARIAS *et al.*, 2004).

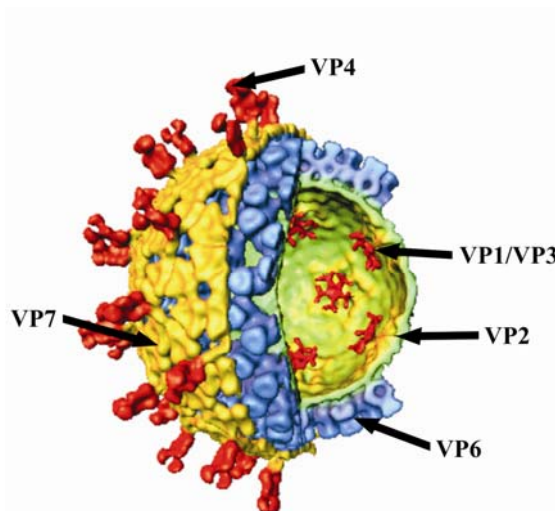


Figura 3 – Representação esquemática da partícula de rotavírus (JAYARAM *et al.*, 2004).

O cerne da partícula é formado por 120 moléculas de proteína viral dois (VP2), que se associa ao capsídeo interno e liga-se com o genoma e as enzimas virais (VP1 e VP3). A VP1 é uma RNA polimerase dependente de RNA (RpRd) com funções de transcriptase e replicase e a VP3 atua com dupla função, a de guanililtransferase e metilase (KAPIKIAN *et al.*, 2001).

Intermediariamente, o capsídeo interno é constituído por 780 moléculas de VP6, que representa a proteína mais abundante, correspondente a 51% da massa viral. O capsídeo externo organiza-se sobre 260 estruturas triméricas da glicoproteína VP7, formando uma superfície lisa, além de 60 dímeros de VP4 que se projetam da superfície do cerne até capsídeo externo (figura 3) (JAYARAM *et al.*, 2004; LÓPEZ *et al.*, 2005). A clivagem proteolítica da VP4, principalmente pela tripsina, resulta em duas subunidades (VP5* e VP8*). Este processo aumenta a infecciosidade viral, facilitando a penetração do vírus na célula (ESTES; COHEN, 1989; KAPIKIAN *et al.*, 2001).

Além de seis proteínas estruturais (VP), há expressão de outras seis proteínas não estruturais (NSP) durante o ciclo de replicação. Dentre estas, a NSP4 destaca-se por estar envolvida nos estágios terminais da maturação viral no retículo endoplasmático rugoso (RER) e por ser a primeira enterotoxina viral descrita (BALL *et al.*, 1996). As principais funções das VP e NSP estão apresentadas na tabela 1.

Tabela 1 – Constituição molecular e principais funções das proteínas virais (protótipo SA-11) (ESTES; COHEN, 1989; MERTENS, 2004).

Segmento genômico	Proteína (kDa)	Localização no vírion	Função
1	VP1 (125)	Cerne	RNA polimerase RNA-dependente; ligante de RNAsf; forma complexo de transcrição com VP3.
2	VP2 (102)	Cerne	Necessária para atividade replicativa de VP1.
3	VP3 (98)	Cerne	Guanililtransferase e metilase; parte do complexo de transcrição com VP1.
4	VP4 (86) VP5* (60) VP8* (28)	Capsídeo externo	Trímeros de VP4 formam as espículas; antígeno neutralizante tipo P, hemaglutinina; clivagem proteolítica resulta em VP5* e VP8*.
5	NSP1 (58)	Proteína não estrutural	Associada com o citoesqueleto; não essencial em algumas cepas.
6	VP6 (48)	Capsídeo interno	Proteína da camada intermediária; hidrofóbica; determinante de grupo e subgrupo; estrutura homotrimérica.
7	NSP3 (34)	Proteína não estrutural	Homodímero; liga-se especificamente ao terminal 3' do mRNA.
8	NSP2 (36)	Proteína não estrutural	NTPase e helicase; envolvida na formação do viroplasma; liga-se a NSP5 e VP1.
9	VP7 (38)	Capsídeo externo	Glicoproteína estrutural da camada externa; antígeno neutralizante tipo G.
10	NSP4 (20)	Proteína não estrutural	Enterotoxina viral; glicoproteína, receptores para brotamento da DLP entre a membrana do RER; modela níveis de cálcio intracelular e replicação de RNA; antígeno neutralizante tipo NSP4.
11	NSP5 (21)	Proteína não estrutural	Interage com NSP2 e NSP6; formas homomultiméricas; ligadora de RNAsf e RNAdf; componente essencial do viroplasma.
	NSP6 (11)	Proteína não estrutural	Interage com NSP5; está encontrada no viroplasma.

2.1 CARACTERÍSTICAS GENÔMICAS

O genoma completo do RV possui um total de 18.550 pares de bases (pb), variando entre 663 e 3.302 pb conforme o segmento. Com exceção do gene 11, que expressa duas proteínas (NSP5-NSP6), os demais são monocistrônicos (tabela 1) (KAPIKIAN *et al.*, 2001).

Diferentes mecanismos de evolução estão associados com diversidade genética dos RV. Mutações pontuais podem levar a mudanças fenotípicas. Através de recombinação, pode ocorrer a permuta de material genético entre duas cepas durante uma infecção mista. Nos rearranjos, são observadas alterações na sequência do segmento genômico, onde alguns segmentos de RNA perdem as disposições iniciais e bandas adicionais são visualizadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA).

2.2 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

Em geral, a infecciosidade do RV está associada à partícula íntegra. É mantida estável entre pH 3.0 a 9.0 e em baixas temperaturas (4 °C) e parcialmente estável até 56 °C. A atividade hemaglutinante é perdida a 45 °C (KAPIKIAN *et al.*, 2001). As partículas são inativadas com formol, etanol, compostos fenólicos e hipoclorito.

O tratamento das partículas com agentes quelantes de cálcio, como EDTA e EGTA, removem o capsídeo externo transformando-as em DLP. As SLP podem ser produzidas submetendo-se as DLP a altas concentrações de cloreto de cálcio ou agentes caotrópicos (ex. cloridrato de guanidina).

Os diferentes tipos de partículas são observados quando uma preparação é submetida à centrifugação isopícnicica em cloreto de césio. As SLP, DLP e TLP têm uma densidade de 1,44 g/cm³, 1,38 g/cm³ e 1,36 g/cm³, respectivamente.

3 CLASSIFICAÇÃO

Sob o aspecto sorológico, os RV obedecem três níveis de especificidade: grupos (sorogrupos) que são determinantes de espécie, subgrupos e sorotipos. Os sorogrupos (A-G) são definidos com base na especificidade antigênica induzida por VP6. Apenas os representantes do grupo A (RV-A), RV-B e RV-C foram diagnosticados em humanos e a predominância das infecções é pelo RV-A, que corresponde a uma prevalência de 90%. Os vírus do RV-B foram associados, frequentemente, aos surtos da doença em adultos, principalmente, na região sudeste do continente asiático. Infecções pelo RV-C ocorrem esporadicamente em focos por todo globo. Os demais grupos foram descritos somente em animais (KAPIKIAN *et al.*, 2001).

Além de grupos, VP6 diferencia os subgrupos (SG). Os RV-A apresentam quatro variantes (SG-I, SG-II, SG-I/II, ou não-SG-I/II). A maioria dos RV detectados em humanos pertence ao SG-II, já em outros animais o predomínio é do SG-I (GEORGES-COURBOT *et al.*, 1988; KAPIKIAN *et al.*, 2001).

As proteínas do capsídeo externo, VP7 e VP4, determinam os sorotipos G (Glicoproteína) e P (sensibilidade a Protease), respectivamente (ESTES; COHEN, 1989).

A EGPA é outro importante método empregado na investigação taxonômica e epidemiológica dos RV, pois os segmentos, de acordo com a sua massa molecular, migram no gel de forma ordenada e definem os perfis eletroforéticos ou eletroferotipos (e-tipo) das cepas (KAPIKIAN *et al.*, 2001). Os RV-A apresentam e-tipo 4:2:3:2, sendo quatro segmentos maiores (classe I, segmentos 1 a 4), dois médios (classe II, segmentos 5 e 6), três pequenos (classe III, segmentos 7, 8 e 9) e dois segmentos menores (classe IV, segmentos 10 e 11). Eletroferotipos de outros grupos são representados na figura 4 (KAPIKIAN *et al.*, 2001).

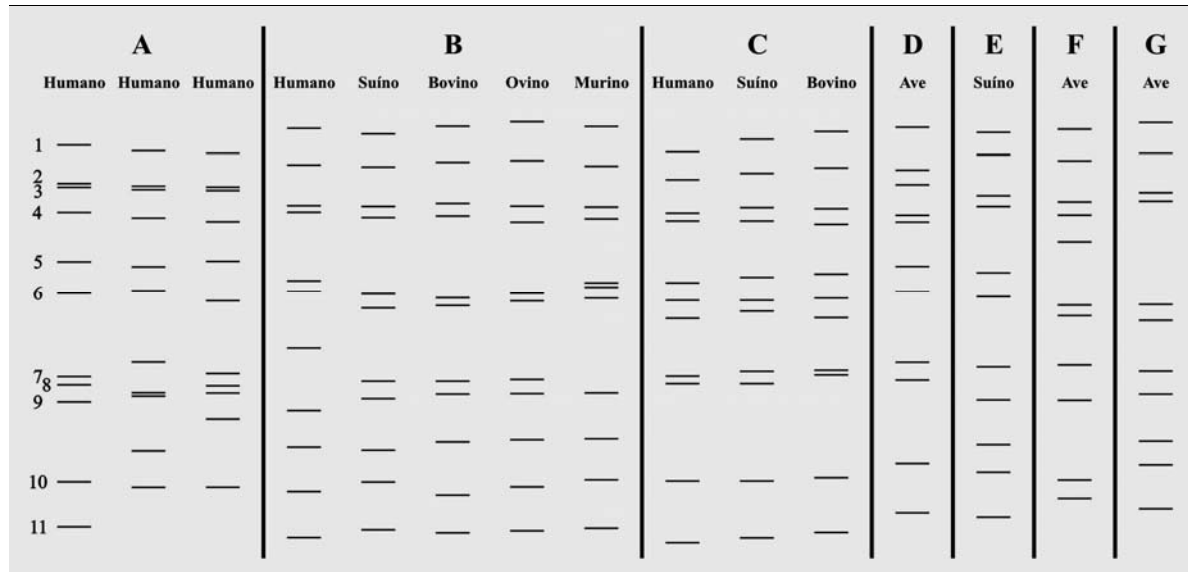


Figura 4 – Diagrama do perfil eletroforético dos segmentos de RNA de rotavírus (grupo A-G) (KAPIKIAN *et al.*, 2001).

Variações eletroforéticas do 11º segmento permitiram diferenciar as cepas de RV em e-tipos L (*long*), S (*short*) e SS (*super short*) (KAPIKIAN *et al.*, 2001).

As características físicas e as propriedades moleculares dos segmentos genômicos 4 e 9, com base na reação em cadeia da polimerase, associada à transcrição reversa (RT-PCR) e o método de eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida (EGPA) permitiram o estabelecimento um sistema binário de classificação aos RV (MULLIS; FALOONA, 1987; ESTES; COHEN, 1989; GOUVEA *et al.*, 1990).

Há correspondência dos sorotipos G como os genótipos G, porém, não há relação dos sorotipos P e genótipos P. Atualmente foram descritos 19 genótipos G e 27 [P], dos quais, as principais combinações descritas em humanos são: G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8] e G9P[8] (SANTOS; HOSHINO *et al.*, 2005; LEITE *et al.*, 2008).

A NSP4 dos RV-A é classificada em cinco genótipos de A-E, sendo os protótipos, respectivamente, (KUN-Humano), (Wa-Humano), (AU-1-Humano), (EW-Murino) e (CH1-Ave) (KAPIKIAN *et al.*, 2001; LIN; TIAN, 2003). Os genótipos A, B e C são encontrados em diversos hospedeiros, como humanos, suínos, caprinos, bovinos, felinos. Ao passo que os genótipos D e E são específicos, respectivamente, para murinos e aves (LIN; TIAN, 2003).

4 CICLO DE REPLICAÇÃO

O ciclo de replicação do RV ocorre no citoplasma, com uma íntima dependência de concentração de íons Ca^{+2} , dependendo das etapas (RUIZ *et al.*, 2000). Outras características são: o RNA(+) nascente serve como mensageiro para a síntese de proteínas, além de intermediário para produção de RNA(-); formação dos segmentos de RNAdf ocorre na partícula subviral nascente; formação de corpúsculo de inclusão citoplasmática associado à membrana (viroplasma) e; brotamento de partícula subviral do viroplasma para o RER com aquisição de membrana provisória (figura 5) (KAPIKIAN *et al.*, 2001).

Durante a etapa de adsorção, VP4 e VP7 participam ativamente do processo. A VP4 tem papel de interação inicial com a célula, incluindo associação a receptores (gangliosídeos GM1 e GM3, integrinas $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$ e $\alpha v\beta 3$) e penetração na célula. Quando submetida a tratamento proteolítico, principalmente com tripsina, esta resulta em duas subunidades VP5* e VP8*, acarretando em um aumento da infecciosidade viral (KAPIKIAN *et al.*, 2001). O papel da VP7 não é bem definido, mas tem sido proposto que pode modular algumas funções de VP4 e interagir com diferentes moléculas de superfície de célula (ARIAS *et al.*, 2004).

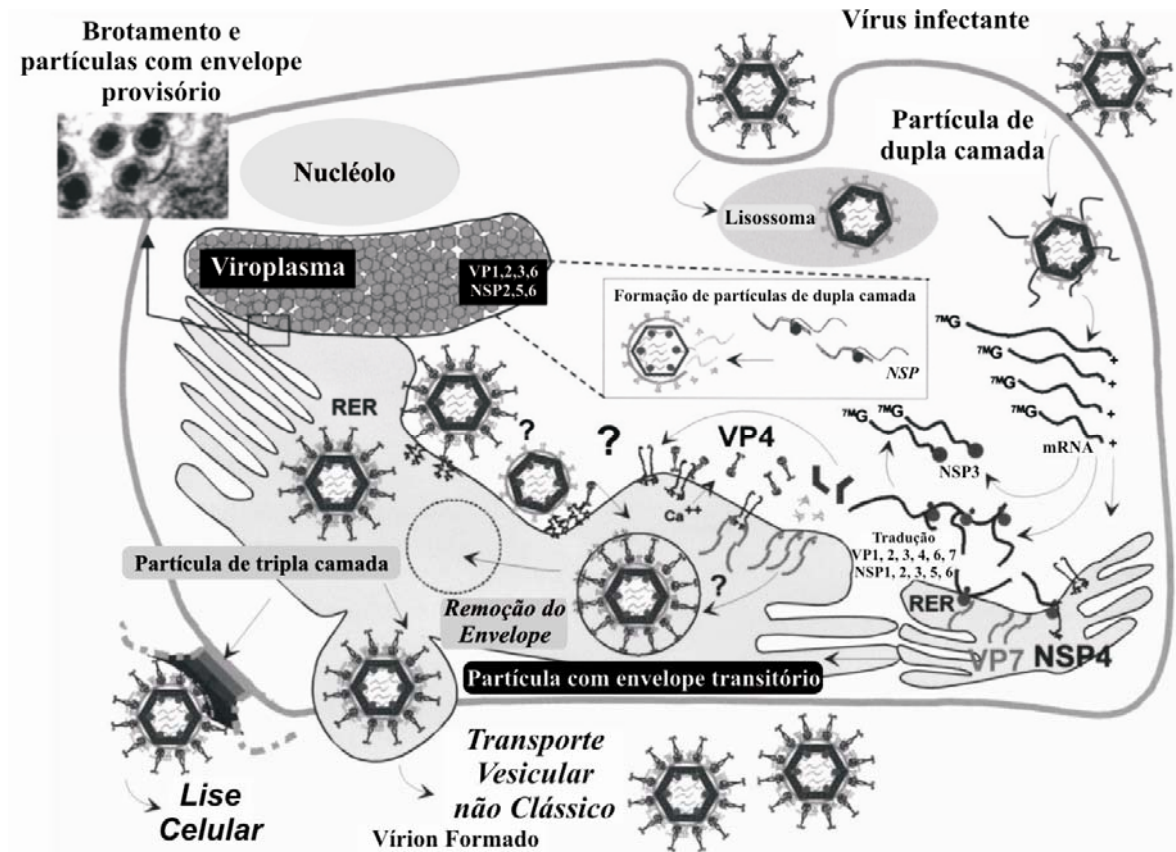


Figura 5 – Ciclo de replicação do rotavírus (Traduzido de KAPIKIAN *et al.*, 2001).

Após a adsorção, a vesícula fagocítica se associa às vesículas lisossomais, resultando no fagossoma onde ocorre o desnudamento (perda do capsídeo externo) e a transformação da partícula em DLP, quando a RpRd é ativada, dando início ao processo de transcrição. As proteínas recém-sintetizadas pelos ribossomos livres, juntamente com os mRNA, e partículas imaturas formam o viroplasma. As proteínas glicosiladas VP7 e NSP4 são sintetizadas em associação como o RER. Do viroplasma, as partículas subvirais nascentes (DLPs) deixam a vesícula e passam para o interior do RER por brotamento. Durante este processo as partículas adquirem, provisoriamente, uma membrana provisória mediada por NSP4. Em seguida, ocorre à montagem das proteínas do capsídeo externo, o que resulta na formação das partículas íntegras. O envelope lipídico é removido por mecanismos desconhecidos. O ciclo de replicação termina com a liberação dos vírions por lise celular (KAPIKIAN *et al.*, 2001).

5 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

A detecção do RV pode ser realizada por técnicas laboratoriais convencionais e através de técnicas rápidas. A partir de material biológico é possível distinguir os RV, por sua morfologia característica, pela microscopia eletrônica (FLEWETT *et al.*, 1974).

Baseando-se na especificidade antigênica de suas estruturas, os RV são classificados em grupos (ou sorogrupos), subgrupos e sorotipos (BEARDS *et al.*, 1980; ESTES; COHEN, 1989). Através de técnicas imunoquímicas que usam vários meios de visualização, os antígenos virais podem ser avaliados, sendo algumas delas de aplicação na rotina de diagnóstico pela rapidez e simplicidade. A reação imunoenzimática (RIE), aglutinação do látex (AL) e a imunocromatografia (ICG) se destacam dentre essas técnicas pela facilidade de execução e análise (BRANDT *et al.*, 1987; GABBAY *et al.*, 2005), porém limitam-se à identificação do RV-A.

Pelas técnicas moleculares, as cepas virais são distinguidas quanto à massa molecular dos segmentos genômicos, caracterizando-os e-tipos, assim como pela RT-PCR de dois segmentos genômicos, caracterizando os genótipos (TANIGUCHI *et al.*, 1982; MULLIS; FALOONA, 1987; GOUVEA *et al.*, 1990).

O isolamento do RV em cultura celular somente foi difundido e utilizado como técnica de diagnóstico, após a utilização do tratamento do inóculo viral com enzimas proteolíticas, como a tripsina, que aumentam a probabilidade da propagação (SATO *et al.*, 1981). A principal cultura utilizada na propagação de RV é derivada de células de rim de macaco, a MA-104. Esta técnica ainda é de grande importância, seja no estudo da citopatologia, no desenvolvimento de técnicas de diagnósticos e no estudo de cepas vacinais.

6 PATOGENIA, IMUNIDADE E EPIDEMIOLOGIA

A rotavirose assume maior gravidade em crianças de tenra idade, de baixo nível socioeconômico ou com deficiência imunológica. A doença tem importante participação nos surtos de gastroenterite em ambientes hospitalares. É tida como altamente contagiosa, uma vez que, dez partículas virais ou menos são suficientes para provocar a doença (WARD *et al.*, 1986). Os vírus são eliminados pelas fezes em altos títulos, aproximadamente 10^9 partículas/grama de fezes, na fase aguda da doença, sendo transmitido pela via orofecal, através de contaminação alimentar. Há indícios de transmissão por outras vias, devido à presença de baixos títulos virais em secreção do trato respiratório e outros fluidos corporais. Há de se considerar também, que os RV são relativamente resistentes às condições adversas do ambiente, podendo permanecer infecciosos fora das células.

A patogenia da infecção pelos RV depende de múltiplos fatores virais e do hospedeiro. A má nutrição agrava a diarreia, retarda a recuperação do intestino e modifica a resposta inflamatória (ZIJLSTRA *et al.*, 1997). A idade é um fator preponderante. Em neonatos, até seis meses, as infecções geralmente são assintomáticas, devido possivelmente, à imaturidade do epitélio intestinal (indiferenciação) ou à baixa secreção de proteases intestinais, fundamentais para desenvolvimento e ativação da infecciosidade viral (GREENBERG *et al.*, 1994; BURKE; DESSELBERGER, 1996; BRESEE *et al.*, 2005). Após o período de maior incidência da doença, entre seis meses e dois anos de idade, as infecções sintomáticas diminuem em frequência, devido à imunidade e outros fatores do indivíduo. A secreção intestinal de mucinas, taxa de reposição do epitélio intestinal e absorção de fluidos são dependentes da idade e afetam a evolução da diarreia (RAMIG, 2004).

Relatos indicam que várias citocinas estão implicadas na imunidade celular em resposta à infecção por RV, dentre elas: IFN- α , IFN- γ , IL-10 e TNF- α . Contudo, a função que essas citocinas desempenham na patogênese e no controle da doença ainda permanece indefinida (JIANG *et al.*, 2002).

A persistência de anticorpos maternos transferidos passivamente ao longo do 1º trimestre de vida auxilia no desenvolvimento imunológico do neonato. Estudos demonstram que a partir do 1º ano de vida inicia-se uma elevação gradual de anticorpos, de modo que até o 34º mês a maioria das crianças (80%) demonstra positividade a IgG sérica (PICKERING *et al.*, 1995; LINHARES; BRESEE, 2000).

Em modelos experimentais, principalmente murinos, têm sido demonstrados que os linfócitos T CD4⁺ são essenciais para a estimulação de IgA intestinal específica contra RV. Da mesma forma os linfócitos T CD8⁺ conferem proteção completa contra a re-infecção por período limitado de tempo. Esta proteção diminui com o passar do tempo e dura até oito meses (FRANCO *et al.*, 1997). Anticorpos IgA anti-VP6 também inativam os RV intracelulares, durante o processo de transcitose da IgA (BURNS *et al.*, 1996).

Os mecanismos imunológicos que envolvem todo o processo de diarreia cauda pelo RV, assim como, a proteção à infecção ainda não estão bem esclarecidos (KAPIKIAN *et al.*, 2001). Estudos têm demonstrado que anticorpos circulantes anti-VP4 e VP7 são capazes de neutralizar os RV e proteger os hospedeiros suscetíveis (OFFIT, 1996).

A distribuição universal dos RV tem sido amplamente estudada. Uma das características da doença é a sazonalidade. Notoriamente, nas regiões de clima tropical, a doença ocorre quase o ano todo com picos nos meses mais frios. Já nos países de clima temperado são observados picos da doença durante o inverno, enquanto no verão, os casos são menos frequentes. (ANSARI *et al.*, 1991).

Dos genótipos G conhecidos, 10 têm sido descritos como patógenos humanos, destacando-se as variantes G1-G4. Além destas, também assumem importância epidemiológica as variantes G5, G6, G8-G10 e G12. Quanto aos genótipos P, as principais ocorrências têm sido por P[8], P[4], P[6] e P[9]. As combinações G1P[8], G2P[4], G3P[8] e G4P[8] representam 88% das cepas circulantes (SANTOS; HOSHINO, 2005), o que justifica serem os alvos das vacinas.

7 VACINA E PREVENÇÃO

A vacina atualmente usada no Brasil é constituída de cepa atenuada RIX4414 (G1P[8]), de origem humana e administrada por via oral. Esta vacina, denominada de Rotarix, é desenvolvida pela Glaxo Smith-Kline Biologicals. Apresenta elevada imunogenicidade e é eficaz contra os principais genótipos (RUIZ-PALACIOS *et al.*, 2006). Há, ainda, em uso a pentavalente com cepas recombinantes humano-bovino que apresentam os genótipos G1, G2, G3, G4 e P[8], denominada de RotaTeq, também com elevado nível de proteção para as formas graves de diarreia (VESIKARI *et al.*, 2006). Além da Rotarix e RotaTeq, foram desenvolvidos outros imunógenos, dentre os quais, a cepa multivalente recombinante bovino-humano (UK-bovine-human reassortant strain, NIH, Bethesda) e a RV3 (University of Melbourne, Austrália). Na China, desde 2000, utiliza-se uma vacina monovalente de origem caprina.

Não há terapia específica para combater a rotavirose. O tratamento é sintomático e nos caso graves em que ocorre a desidratação intensa, recomenda-se a imediata restauração do equilíbrio eletrolítico. A prevenção, além da vacinação, requer a aplicação dos meios básicos de higiene.

Sendo assim, faz-se necessário o estudo epidemiológico contínuo do agente para identificação das cepas circulantes, em virtude da variabilidade genética do vírus em função da pressão seletiva que as mesmas são submetidas na natureza. Os estudos permitem também o melhor entendimento da patogenia da infecção, além da avaliação do efeito que o programa de imunização vem produzindo no âmbito das cepas circulantes. Contribuições também podem ser obtidas com relação às tendências que visam à inclusão de novos sorotipos/genótipos nos imunógenos, para o controle da infecção.

8 OBJETIVOS

8.1 OBJETIVO GERAL

- Detectar e caracterizar cepas de *Rotavirus* humanos a partir de amostras fecais, provenientes dos municípios de Ponta Grossa, Londrina e Assaí – Paraná.

8.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Detectar cepas de rotavírus humanos pelas técnicas de aglutinação do látex (AL), imunocromatografia (ICG) e microscopia eletrônica (ME).
- Analisar os eletroferotipos das cepas encontradas.
- Determinar os genótipos de VP4 e VP7 por RT-PCR-ELISA e os genótipos de NSP4 por RT-PCR das cepas detectadas.

REFERÊNCIAS

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

ANSARI SA, SPRINGTHORPE VS, SATTAR SA. Survival and vehicular spread of human rotaviruses: possible relation to seasonality of outbreaks. *Reviews of Infectious Diseases* 1991; 13:448-461.

ARIAS CF, DECTOR MA, SEGOVIA L, LÓPEZ T, CAMACHO M, ISA P, ESPINOSA R, LÓPEZ S. RNA silencing of rotavirus gene expression. *Virus Research* 2004; 102: 43-51.

BAKER TS, OLSON NH, FULLER SD. Adding the third dimension to virus life cycles: three-dimensional reconstruction of icosahedral viruses from cryo-electron micrographs. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 1999; 63: 862-922.

BALL JM, TIAN P, ZENG CQ, MORRIS AP, ESTES MK. Age-dependent diarrhea induced by a rotaviral nonstructural glycoprotein. *Science* 1996; 272: 101-104.

BEARDS GM, PILFOLD JN, THOULESS ME, FLEWETT TH. Rotavirus serotypes by serum neutralization. *Journal of Medical Virology* 1980; 5: 231-237.

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.

BLUTT SE, FENAUX M, WARFIELD KL, GREENBERG HB, CONNER ME. Active viremia in rotavirus-infected mice. *Journal of Virology* 2006; 80: 6702-6705.

BRANDT CD, ARNDT CW, EVANS GL, KIM HW, STALLINGS EP, RODRIGUEZ WJ, PARROTT RH. Evaluation of a latex test for rotavirus detection. *Journal of Clinical Microbiology* 1987; 25: 1800-1802.

BRESEE JS, PARASHAR UD, WIDDOWSON M, GENTSCH JR, STEELE AD, GLASS RI. Update on rotavirus vaccines. *Pediatric Infectious Disease Journal* 2005; 24: 947-952.

BURKE B, DESSELBERGER U. Rotavirus pathogenecity. *Virology* 1996; 218: 299-305.

BURNS JW, SIADAT-PAJOUH M, KRISHNANEY AA, GREENBERG HB. Protective effect of rotavirus VP6-specific IgA monoclonal antibodies that lack neutralizing activity. *Science* 1996; 272: 104-107.

DAVIDSON GP, GOLLER I, BISHOP RF, TOWNLEY RR, HOLMES IH, RUCK BJ. Immunofluorescence in duodenal mucosa of children with acute enteritis due to a new virus. *Journal of Clinical Pathology* 1975; 28: 263-266.

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

FLEWETT TH, BRYDEN AS, DAVIES H. Diagnostic electron microscopy of faeces: II Acute gastroenteritis associated with reovirus-like particles. *Journal of Clinical Pathology* 1974; 27: 608-614.

FLEWETT TH. Virus particles in gastroenteritis. *Lancet* 1973; 2: 1497, 1973.

FRANCO MA, TIN C, GREENBERG HB. CD8+ T cells can mediate almost complete short-term and partial long-term immunity to rotavirus in mice. *Journal of Virology* 1997; 71: 4165-4170.

GABBAY YB, MORAIS MAA, ALVES AS, OLIVEIRA KK, MASCARENHAS JD^{arcP}; LINHARES AC. Detecção de rotavírus por imunocromatografia: ensaio simples e de rápida execução. *Revista Paraense de Medicina* 2005; 19: 13-18.

GEORGES-COURBOT MC, BERAUD AM, BEARDS GM, CAMPBELL AD, GONZALEZ JP, GEORGES AJ, FLEWETT TH. Subgroups, serotypes, and electrophoretotypes of rotavirus isolated from children in Bangui, Central African Republic. *Journal of Clinical Microbiology* 1988; 26: 668-671.

GOUVEA V, GLASS RI, WOODS P, TANIGUCHI K, CLARK HF, FORRESTER B, FANG ZY. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 1990. 28: 276-282.

GREENBERG HB, CLARK HF, OFFIT PA. Rotavirus pathology and pathophysiology. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 1994; 185: 255-283.

HERRING AJ, INGLIS NF, OJEH CK, SNODGRASS DR, MENZIES JD. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. *Journal of Clinical Microbiology* 1982; 16: 473-477.

HYPERLINKS:

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Rotavirus. Disponível em: <http://www.who.int/nuvi/rotavirus/en/>. Acesso em: 02 de fevereiro. 2009.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES. Type Species. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/fs_reovi.htm#Type03. Acesso em: 07 de outubro. 2008.

JAYARAM H, ESTES MK, PRASAD BVV. Emerging themes in rotavirus cell entry, genome organization, transcription and replication. *Virus Research* 2004; 101: 67-81.

JIANG B., GENTSCH JR, GLASS RI. The role of serum antibodies in the protection against rotavirus a disease: An overview. *Clinical Infectious Diseases* 2002; 34: 1351-1361.

KAPIKIAN AZ, KIM HW, WYATT RG, RODRIGUEZ WJ, ROSS S, CLINE WL, PARROTT RH, CHANOCK RM. Reoviruslike agent instools: association with infantile diarrhea and development of serologic tests. *Science* 1974, 185: 1049-1053.

KAPIKIAN AZ, HOSHINO Y, CHANOCK RM. Rotaviruses. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE, editors. *Field's Virology*, 4th edn. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins Co, 2001: 1787-1833.

LAEMMLI UK. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-685.

LEITE JPG, CARVALHO-COSTA FA, LINHARES AC. Group A rotavirus genotypes and the ongoing Brazilian experience - a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2008; 103: 745-753.

LIGHT JS, HODES HL. Studies on epidemic diarrhea of the newborn: isolation of a filtrable agent causing diarrhea in calves. *American Journal of Public Health* 1943; 33: 1451-1943.

LINHARES AC, PINHEIRO FP, SCHMETZ C, MULLER G, PETERS D. Duovírus (rotavírus) em Belém do Pará (nota prévia). *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 1977; 19: 278-279.

LINHARES AC, BRESEE JS. Rotavirus vaccines and vaccination in Latin America. *Pan American Journal of Public Health* 2000; 8: 305-31

LÓPEZ T, CAMACHO M, ZAYAS M, NÁJERA R, SÁNCHEZ R, ARIAS CF, LÓPEZ S, Silencing the morphogenesis of rotavirus. *Journal of Virology* 2005; 79: 184-192.

MALHERBE HH, HARWIN R, ULRICH M. The cytopathic effect of vervet monkey viruses. *South African Medical Journal* 1963; 37: 407-411.

MALHERBE HH, STRICKLAND-CHOLMLEY M. Simian virus SA-11 and the related "O" agent. *Archive für die Gesamte Virusforsch* 1967; 22: 235-245.

MATTHEWS REF. The classification and nomenclature of viruses: summary of results of meetings of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Intervirology* 1979; 11: 133-135.

MEBUS CA, UNDERDAHL NR, RHODES MB, TWIEHAUS MJ. Calf diarrhea (scours): reproduced with a virus from a field outbreak. *Research Bulletin* 1969; 233: 1-16.

MERTENS P. The dsRNA viruses. *Virus Research* 2004; 101: 3-13.

MULLIS KB, FALOONA FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* 1987; 155: 335-350.

OFFIT PA. Host factors associated with protection against rotavirus disease: the skies are clearing. *Journal of Infectious Diseases* 1996; 174(Suppl. 1): S59-64.

PICKERING LK, MORROW AL, HERRERA I, O'RYAN M, ESTES MK, GUILLIAMS SE, JACKSON L, CARTER-CAMPBELL S, MATSON DO. Effect of maternal rotavirus immunization on milk and serum antibody titers. *The Journal of Infectious Diseases* 1995; 172: 723-728.

RAMIG RF. Pathogenesis of intestinal and systemic rotavirus infection. *Journal of Virology* 2004; 78: 10213-10220.

RUIZ-PALACIOS GM, PEREZ-SCHAEEL I, VELAZQUEZ FR, ABATE H, BREUER T, CLEMENS SC, CHEUVART B, ESPINOZA F, GILLARD P, INNIS BL, CERVANTES Y, LINHARES AC, LÓPEZ P, MACÍAS-PARRA M, ORTEGA-BARRÍA E, RICHARDSON V, RIVERA-MEDINA DM, RIVERA L, SALINAS B, PAVÍA-RUZ N, SALMERÓN J, RÜTTIMANN R, TINOCO JC, RUBIO P, NUÑEZ E, GUERRERO ML, YARZÁBAL JP, DAMASO S, TORNIEPORTH N, SÁEZ-LLORENS X, VERGARA RF, VESIKARI T, BOUCKENOOGHE A, CLEMENS R, VOS BD, O'RYAN M. Safety and efficacy of an

attenuated vaccine against severe rotavirus gastroenteritis. *The New England Journal of Medicine* 2006; 354: 11-22.

RUIZ MC, COHEN J, MICHELANGELI F. Role of Ca²⁺ in the replication and pathogenesis of rotavirus and other viral infections. *Cell Calcium* 2000; 28: 137-149.

SANTOS ACS. *Caracterização de cepas de rotavírus humanos em cultura de células*. Dissertação de mestrado - Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2007.

SANTOS N, HONMA S, TIMENETSKY MCST, LINHARES AC, USHIJIMA H, ARMAH GE, GENTSCH JR, HOSHINO Y. Development of a microtiter plate hybridization-based PCR–enzyme-linked immunosorbent assay for identification of clinically relevant human group A rotavirus G and P genotypes. *Journal of Clinical Microbiology* 2008; 46: 462–469.

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

SANTOS N, NOZAWA C. Comparação dos testes de AL, ME, e EGPA na detecção de rotavírus em fezes diarréicas de crianças. *Revista Brasileira de Patologia Clínica* 1989; 25: 117-120.

SATO K, INABA Y, SHINOZAKI T, FUJII R, MATUMOTO M. Isolation of human rotavirus in cell cultures. *Archives of Virology* 1981; 69: 155-160.

TANIGUCHI K, URASAWA S, URASAWA T. Electrophoretic analysis of RNA segments of human rotaviruses cultivated in cell culture. *Journal of General Virology* 1982; 60, 171-175.

URASAWA T, URASAWA S, TANIGUCHI K. Sequential passages of human rotavirus in MA-104 cells. *Microbiology and Immunology* 1981; 25: 1025-1035.

VESIKARI T, MATSON DO, DENNEHY P, VAN DAMME P, SANTOSHAM M, RODRIGUEZ Z, DALLAS MJ, HEYSE JF, GOVEIA MG, BLACK SB, SHINEFIELD HR, CHRISTIE CDC, YLITALO S, ITZLER RF, COIA ML, ONORATO MT, ADEYI BA, MARSHALL GS, GOTHEFORS L, CAMPENS D, KARVONEN A, WATT JP, O'BRIEN KL, DINUBILE MJ, CLARK HF, BOSLEGO JW, OFFIT PA, HEATON PM. Safety and efficacy of a pentavalent human-bovine (WC3) reassortant rotavirus vaccine. *The New England Journal of Medicine* 2006; 354: 23-33.

WARD RL, BERNSTEIN DI, YOUNG EC, SHERWOOD JR, KNOWLTON DR, SCHIFF GM. Human rotavirus studies in volunteers: determination of infectious dose and serological response to infection. *Journal of Infectious Diseases* 1986; 154: 871-880.

ZIJLSTRA RT, DONOVAN SM, ODLE J, GELBERG HB, PETSCHOW BW, GASKINS HR. Protein-energy malnutrition delays small-intestinal recovery in neonatal pigs infected with rotavirus. *Journal of Nutrition* 1997; 127: 1118-1127.

10 ARTIGO**Detection and characterization of human strains of rotavirus in hospitalized patients
from the cities of Ponta Grossa, Londrina and Assai – Pr.**

Gustavo Franchesco Kerntopf^a, Érika da Silva Czernisz^a, Daniele Albuquerque^a, Priscila Romanin^a, José Felipe Eliseu Freitas^a, Norma Santos^b, Fabrício José Benati^b, Eduardo Pietruchinski^a, Rosa Elisa Carvalho Linhares^a and Carlos Nozawa^{a*}

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

^b Departamento de Virologia. Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes. UFRJ. Caixa
Postal 68040. CEP 21944-970. Rio de Janeiro, RJ. Brazil.

*To whom correspondence should be addressed

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

Phone: +55 43 3371 4617; fax: +55 43 33714788.
e-mail: cnoz@uel.br

Abstract

The acute diarrheal disease is still one of the major public health problems worldwide. Rotaviruses (RV) are the most important viral etiologic agents and children under five years of age are the target population. Presently, we investigated the participation of RV in hospitalized patients suffering from acute diarrhea from the cities of Ponta Grossa, Londrina and Assai - Parana. The following tests were used: latex agglutination test (LA); immunochromatography (ICG); polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and negative staining electron microscopy (ME). For the genotyping, RT-PCR and RT-PCR-ELISA were used, respectively, for NSP4 and VP4/VP7. Out of 124 samples we demonstrated 69 positive stools samples for RV, for at least one of the tests used. Amongst them, 67 strains belonged to the group A (RV-A). Overall, most of the RV positive stools samples were from children under six years of age, however, 10 positive cases occurred in patients aged 19 years or above, including an 81 years old patient. The data showed similar electropherotypes and genotypes G, P and NSP4 of the inland wild circulating strains of RV.

Keywords: Rotavirus. Detection. Hospitalized patients. Genotyping

1. Introduction

The acute diarrheal disease is still one of the major public health problems worldwide. Rotaviruses (RV) are the most important etiologic agents and children under five years of age are the target population. Moreover, a variety of infant animals are equally affected by species-specific virus strains. RV cause approximately 112 millions of domestic episodes of diarrhea, 25 millions of clinic visits, 2 millions of hospitalizations and circa of 611,000 deaths in children under five years of age, worldwide, annually (Angel *et al.*, 2007).

RV are icosahedric virions, non-enveloped, and present a triple and concentric layers of proteins (Estes & Cohen, 1989; Yeager *et al.*, 1990). The inner layer is formed by virus protein 2 (VP2) and involve the genome, the VP1 (RNA polymerase dependent of RNA) e a VP3 (guanylyltransferase e methylase). The intermediate layer is made up of VP6 associated to VP2 and confers the structure the so-called doble-layered particles (DLP). The outer layer is constituted by trimeric structures of VP7 glycoprotein and the dimeric spikes of VP4 forming the triple-layered particles (TLP), the infectious form of the virus. Virus genome is represented by 11 segments of double-stranded RNA.

Based on antigenic specificity of VP6, RV are classified into seven groups (A-G), prevailing the infections by group A strains (RV-A) (Estes & Cohen, 1989). Moreover, VP6 epitopes allow the differentiation of strains into sub-groups (SG-I, SG-II, SG-I/II, and non-SG-I/II), prevailing SG-II in human infections (Kapikian *et al.*, 2001). G and P genotyping is attributed, respectively, to VP7 and VP4 (Estes & Cohen, 1989). By poliacrylamide gel electrophoresis (PAGE) RV are classified into seven electropherotypes (e-type) from A-G according to the migration pattern of the 11 RNA segments. Moreover, group A strains can be further classified according to the mobility of the segments 10 and 11 into long (L), short (S) and super-short (SS) electropherotypes according to the migration pattern (Espejo *et al.*, 1979; Matsuno *et al.*, 1985).

Genotypes G1-G4 and G9 combined with P[8] and P[4] are the most prevalent worldwide (approximately 90%) (Beards *et al.*, 1989; Khamrin *et al.*, 2007). Concerning NSP4 genotyping, B type has been shown the most common in the world (Iturriza-Gómara *et al.* 2003, Cho *et al.* 2006).

Presently, two types of RV vaccine are available (Rotarix and RotaTeq) and their safety and efficacy to prevent and/or attenuating severe diarrhea episodes have been proved (Vesikari *et al.*, 2006; Ruiz-Palacios *et al.*, 2006).

Bearing in mind of the genetic variability of the virus, either vaccine or host natural immunity to the virus or both may pose a selective pressure that may result in emergence of unusual genotypes. Crossing species barrier is also another possibility for the appearance of mutant strains. In fact, hitherto undescribed genotypes have been found (Solberg *et al.*, 2009). This selective event may represent a significant serological change with real impact in the epidemiology of the disease. Therefore, it is important to monitor wild strains of the virus in order to evaluate all these consequences.

Presently, we evaluated circulating human RV strains in three locations of the State of Parana.

2. Materials and Methods:

Feces

One hundred and twenty-four fecal samples were collected from April 2005 to March 2009 from hospitalized patients suffering from acute diarrhea, from private and public hospitals of the cities of Assai, Londrina and Ponta Grossa - Parana.

Negative Staining Electron Microscopy

For transmission electron microscopy (EM) raw stools samples were processed by super direct negative staining with 2% sodium phosphotungstate pH 6.3, as described elsewhere (Santos & Nozawa, 1989).

Immunochromatography and Latex Agglutination Tests

Stools samples were also homogenized at 20% (v:v) in PBS, pH 7.3, and clarified by centrifugation at 450xg/10 min. Clarified homogenate were submitted to the following tests, immunochromatography (ICG) (Vikia - Rota Adeno, Biomérieux SA, Fr.) or latex agglutination (LA) (Virotect Rota, Omega Diagnostic Ltd., UK), according to the manufacturer's recommendations.

Polyacrilamide Gel Electrophoresis

Clarified fecal homogenates were further submitted to virus RNA extraction as described before (Herring *et al.*, 1982) for PAGE.

RT-PCR and PCR-ELISA

For RT-PCR virus RNA was extracted from stools using the TRIzol method (Invitrogen, Carlsbad, USA) and subjected to reverse transcription followed by PCR. The cDNA of VP7 or VP4 gene was synthesized by using primers labeled with biotin at their 5' ends. For PCR-ELISA detection of labeled PCR products and identification of the genotypes of positive samples, briefly, 96-well microplates (Nunc-Immuno module; Nunc, Roskilde, Denmark) coated with streptavidin (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Germany) were

used. To each well the biotin-labeled PCR product was distributed (one reaction per genotype) followed by the addition of type-specific digoxigenin-labeled probe. Individual G- or P-type specific probe mixtures (three type-specific probes/genotype/mixture) were distributed onto the plates. This was followed by the addition of anti-digoxigenin peroxidase conjugate (Roche Diagnostic GmbH); the substrate (TMB peroxidase substrate system; KPL, Gaithersburg, MD), and absorbance read at 450 nm within 10 min (Santos *et al.*, 2008). For NSP4 typing Nested-PCR was used and primers used are listed in table 1., including those for VP7 and VP4 typing.

Table 1 – VP7, VP4 and NSP4 primers used for amplification and genotyping

Primers	Sequence	Position	Gene
Beg9 (+)	GGCTTTAAAAGAGAGAATTTCCGTCTGG	1–28	VP7
End9 (–)	GGTCACATCATAACAATTCTAATCTAAG	1036–1062	VP7
Con2 (–)	ATTTCCGACCATTTATAACC	887–868	VP4
Con3 (+)	TGGCTTCGCTCATTATAGACA	11–32	VP4
NSP4-1a (+)	GGCTTTAAAAGTTCTGTTCCG	1–12	NSP4
NSP4-2b (–)	GGTCACATTAAGACCGTTCC	750–731	NSP4
NSP4-Kun-1a (+)	ATTGATAGTGCGATCGACTGG	439–460	NSP4-A
NSP4-Wa-1a (+)	GGCTGGATATAAAGAGCAGG	286–306	NSP4-B
NSP4-RRV-1a (+)	AACGATTGGGCTGAAAGGTG	508–528	NSP4-C

3. Results

From 124 stools samples evaluated 69 were positive for RV (55.6%) (69/124), for at least one of the methods used. Amongst these 69 positive samples, 63 (88.4%) were considered RV-A, as demonstrated by serological methods, being positive either by ICG or LA. Additionally, 4 strains were also defined as RV-A by electrophoretic pattern by PAGE. Therefore, overwhelmingly, a total of 67 strains out of 69 (97.1%) belonged to the group A of rotavirus. Individually, the performance of the methods used accounted for the following results: For LA, 66 samples were analyzed and 23 were positive (34.8%). For ICG, 40 samples were positive out of 64 (62.5%). For PAGE, out of 124 samples 47 were positive (37.9%), being 26 strains, 55.2% (26/47), with short pattern electropherotypes and 20, 42.5% (20/47), with long pattern. For EM, 47 samples were tested and 11 were positive (23.4%). As far as genotyping is concerned, out of the 124 samples, 44 samples (35.4%) were amplified as following. Eleven samples amplified, individually, either for NSP4-A (6) or NSP4-B (5). Thirteen samples amplified for the double combinations G1/NSP4-B (2), G1P[8] (1), G2/NSP4-A (1), P[4]/NSP4-A (6), and P[8]/NSP4-B (3). Twenty samples amplified for the triple combinations G1P[8]/NSP4-B (6), G2P[4]/NSP4-A (12) and G9P[8]/NSP4-B (2). Genotypes G1, G2 and G9 accounted for 37.5% (9/24), 54.1% (13/24), and 8.3% (2/24) of the strains detected, respectively. In our study genotyping VP4 demonstrated that P[4] was prevalent in 56.2% (18/32) in comparison to 43.7% (14/32) of P[8]. Genotyping of NSP4 accounted for 56.8% (25/44) for type A and 43.2% for type B.

Overall, the comparative analysis of the methods used for the detection of RV, the results demonstrated the following. Eight samples were positive by two tests concomitantly, 30 samples positive by three tests, nine samples positive for four tests, and none was positive for the five tests used. Moreover, four samples were negative for all the five tests.

According to the ages of the patients and considering the total RV positivity of 69 strains out of 124 stool samples, the distribution was defined, as following: 44 positive in children aged five years or less (63.8%, 44/69) and 12 positive in children from six to 11 years of age. Positive cases in adults were detected in three patients from 12 to 18 years and 10 in patients over 19 years of age, including an 81-year-old male patient, overall representing 18.8% (13/69) (table 2).

Table 2 – Distribution of rotavirus positive cases according to the age of the patient

Age group (year)	N° (%)
≤ 5	44 (63.8)
6-11	12 (17.4)
12-18	3 (4.3)
≥ 19	10 (14.5)
Total	69 (100)

Table 3 – Rotavirus strains detected with the respective methods of detection

Strains	Age (years)	LA	ICG	E-type ^a	EM	Genotypes ^b		
						VP7	VP4	NSP4
ASS08/001	1	ND ^c	-	-	+	NA ^d	NA	NA
ASS08/003	4	ND	+	L	+	NTD ^e	NTD	A
ASS08/004	2	ND	-	-	+	NA	NA	NA
LON08/016	2	+	ND	S	ND	G2	P[4]	A
LON08/018	2	+	ND	S	ND	G2	P[4]	A
LON08/019	3	-	ND	S	ND	NTD	NTD	A
LON08/022	7	+	ND	S	+	NTD	NTD	NTD

PGR05/001	1	-	ND	-	-	NTD	NTD	B
PGR05/002	3	+	ND	L	ND	G1	NTD	B
PGR05/006	3	+	ND	-	-	NTD	NTD	NTD
PGR05/010	11	-	ND	L	+	G1	P[8]	B
PGR05/011	6	+	ND	L	ND	NTD	P[8]	B
PGR05/012	1	+	ND	L	ND	NTD	NTD	NTD
PGR05/013	10	+	ND	-	-	NA	NA	NA
PGR05/015	1	+	ND	L	ND	G1	P[8]	B
PGR05/016	12	+	ND	L	ND	G1	P[8]	B
PGR05/019	14	-	ND	-	-	NTD	NTD	B
PGR05/020	2	+	ND	L	ND	NTD	NTD	B
PGR05/021	9	+	ND	-	-	NA	NA	NA
PGR05/023	0.4	+	ND	L	ND	NTD	NTD	NTD
PGR05/024	0.8	-	ND	L	ND	NTD	NTD	B
PGR05/025	1	+	ND	-	ND	NTD	NTD	NTD
PGR05/026	14	+	ND	S	ND	NTD	P[8]	B
PGR05/027	0.9	+	ND	L	ND	G1	P[8]	B
PGR05/030	1	-	ND	L	ND	NTD	NTD	NTD
PGR05/031	7	+	ND	L	ND	NTD	NTD	NTD
PGR05/032	7	+	ND	L	ND	NTD	NTD	NTD
PGR05/033	4	+	ND	L	ND	G1	P[8]	B
PGR05/034	1	+	ND	-	ND	G1	NTD	B
PGR05/039	2	+	ND	L	+	G1	P[8]	B
PGR05/042	58	+	ND	L	+	G9	P[8]	B
PGR05/043	46	+	ND	L	ND	NTD	P[8]	B
PGR05/045	22	+	ND	NTD	ND	NTD	NTD	B
PGR05/046	0.8	+	ND	L	ND	G9	P[8]	B

PGR05/049	3	+	ND	L	+	G1	P[8]	NTD
PGR08/001	4	ND	+	S	ND	NTD	P[4]	A
PGR08/002	81	ND	+	S	ND	G2	P[4]	A
PGR08/003	5	ND	+	-	-	NA	NA	NA
PGR08/004	4	ND	+	S	ND	G2	P[4]	A
PGR08/005	2	ND	+	-	-	NA	NA	NA
PGR08/006	1	ND	+	S	ND	NTD	P[4]	A
PGR08/007	3	ND	+	S	ND	NTD	P[4]	A
PGR08/008	3	ND	+	-	-	NA	NA	NA
PGR08/009	10	ND	+	-	-	NA	NA	NA
PGR08/010	6	ND	+	-	-	NA	NA	NA
PGR08/011	1	ND	+	S	ND	G2	P[4]	A
PGR08/012	6	ND	+	-	-	NA	NA	NA
PGR08/013	22	ND	+	S	ND	G2	P[4]	A
PGR08/014	2	ND	+	-	-	NA	NA	NA
PGR08/015	2	ND	+	S	ND	NTD	NTD	A
PGR08/016	1	ND	+	S	ND	NTD	P[4]	A
PGR08/017	52	ND	+	S	ND	NTD	NTD	A
PGR08/018	21	ND	+	S	+	G2	P[4]	A
PGR08/019	3	ND	+	-	-	NA	NA	NA
PGR08/020	3	ND	+	-	-	NA	NA	NA
PGR08/021	4	ND	+	S	ND	NTD	P[4]	A
PGR08/022	5	ND	+	S	ND	G2	P[4]	A
PGR08/023	4	ND	+	S	ND	NTD	P[4]	A
PGR08/024	3	ND	+	S	ND	G2	P[4]	A
PGR08/025	30	ND	+	S	ND	G2	P[4]	A
PGR08/026	7	ND	+	-	-	NA	NA	NA

PGR08/027	63	ND	+	S	+	NTD	NTD	A
PGR08/028	6	ND	+	-	-	NA	NA	NA
PGR08/029	45	ND	+	S	ND	G2	NTD	A
PGR08/030	1	ND	+	S	ND	G2	P[4]	A
PGR08/031	4	ND	+	-	-	NA	NA	NA
PGR08/032	4	ND	+	S	ND	G2	P[4]	A
PGR08/033	1	ND	+	S	+	NTD	NTD	A
PGR08/034	1	ND	+	-	ND	NA	NA	NA

^a Eletropherotype, L, long; S, short.

^b Antigenic specificity carried by indicated protein.

^c ND, not done.

^d NA, not amplified.

^e NTD, not determined.

4. Discussion and conclusion

This study demonstrated the outstanding importance of RV as the causative of acute diarrheal disease, accounting for a positivity of 55.6%, particularly because all the subjects studied were hospitalized patients. Overwhelmingly, most of the RV positive stools samples were from children under six years of age. This epidemiological feature has been taken for granted, but, increasingly, adults have been affected by the disease. Infection of RV in adults seems to be common and has been reported not only in geriatric patients, disabled individuals, health attendants and households with children (Wenman et al., 1979; Anderson & Weber, 2004; Iijima et al., 2006; Carraro et al., 2008). Presently, we found that 18.8% of the positive samples were from young adults and adults from 12 years of age to patients over 19 years of age, including an 81 years old patient. It is suggested that the number of adults infected by RV would be greater, and studies involving adults should be encouraged. It would be reasonable to postulate that symptomatic or asymptomatic adults could serve as source of infection to the children, as was also suggested (Barnes et al., 2003; Pietruchinski et al., 2006). In this study RV-A, as a rule, accounted for 97.1% of the cases, as most of the world reports have demonstrated (Parashar et al., 2006; Munford et al., 2007; Surendran, 2008). The electropherotypes of these strains of RV-A showed a slight predominance of short pattern in comparison to the long-patterned strains, albeit, unusual, this has been reported in India (Saravanan et al., 2004). In general, the predominance of long e-types has been reported throughout the world (Maunula & von Bonsdorff, 2002; Urbina et al., 2004; Modarres et al., 2008; Aminu et al., 2008; Santos et al., 2008), however, variation has been shown according to some genotypes. As far as VP7 genotyping is concerned our study revealed greater incidence of G2 secondly by G1. Although in general, greater incidence has been attributed to G1 worldwide, in Brazil, however, temporally/seasonally there has been a change of prevalence between G1 and G2, as elsewhere demonstrated (Munford et al., 2007; Leite et al.,

2008). In our study, the greater incidence of G2 may be explained by geographical features or due to the small sampling. Nevertheless, these results demonstrated the occurrence of G types common in most of the countries, including Brazil (Beards *et al.*, 1989; Khamrin *et al.*, 2007; Leite *et al.*, 2008) combined with P[4] or P[8]. For VP4 genotyping, similar profile of prevalence has been found in other countries and in Brazil, and the analysis underlying varied epidemiological features is also possible, between the two major genotypes presently found, P[4] and P[8]. As for NSP4 genotyping, we found that type A accounted for the most strains detected. B type NSP4 has been shown the most common in the world (Iturriza-Gómara *et al.* 2003; Cho *et al.* 2006), however, in Brazil, this is true for the southeastern area (Araujo *et al.*, 2007), but not for the northern region, where A type is prevalent (Mascarenhas *et al.*, 2007). The data reported in our work demonstrated similar profile of the wild circulating strains of RV, as compared to data obtained elsewhere in the world and in our country. Molecular and serological nuances are mainly attributed to factors, such as, RV genotypic and phenotypic variability; interspecies barriers crossing; host immunity pressure - naturally or artificially acquired, as well as, geographical and seasonal features. The apparent increase of adult infection and the large number of untyped strains, albeit, positive by other testes, as we found in our work, might be a demonstration of the *steady state* referred before. Therefore, the emergence of new RV strains should be expected. The effect of RV vaccination recently launched in our country is of major benefit for preventing the disease, however, changing in RV genotypes might also be expected as a result of a selective evolutionary process. Concluding, the threat posed by RV still represents a heavy sanitary and economical burden and has to be carefully treated.

5. References:

- Aminu, M., Esona, M.D., Geyer, A. & Steele, A.D. (2008) Epidemiology of rotavirus and astrovirus infections in children in Northwestern Nigeria. *An Afr Med*, **4**:168 – 174
- Anderson, E.J. & Weber, S.G. (2004) Rotavirus infection in adults. *Lancet Infect Dis*, **4**: 91-99.
- Angel, J., Franco, M.A. & Greenberg, H.B. (2007) Rotavirus vaccines: recent developments and future considerations. *Nat Rev Microbiol*, **5**:529-539.
- Araújo, I.T., Heinemann, M.B., Mascarenhas, J.D.P., Assis, R.M.S., Fialho, A.M. & Leite, J.P.G. (2007) Molecular analysis of NSP4 and VP6 genes of rotavirus strains recovered from hospitalized children in Rio de Janeiro, Brazil. *J Med Microbiol* **56**:854-859.
- Barnes, G.L., Callaghan, S.L., Kirkwood, C.D., Bogdanovic-Sakran, N., Johnston, L.J. & Bishop, R.F. (2003) Excretion of serotype G1 rotavirus strains by asymptomatic staff: A possible source of nosocomial infection. *J Pediatr*, **142**:722-725.
- Campos, C.O., Albuquerque, M.C.M., Soares, C.C., Volotão, E.M. & Santos, N. (2003) Epidemiologia das gastroenterites associadas aos rotavírus e adenovírus em humanos na cidade do Rio de Janeiro no período de 1998 a 2002. *R Ci Méd Biol*, **2**:21-29.
- Carraro, E., Perosa, A.H.S., Siqueira, I., Pasternak, J. & Martino, M.D.V. (2008) Rotavirus infection in children and adult patients attending in a tertiary hospital of São Paulo, Brazil. *Braz J Infect Dis*, **12**: 44-46.
- Cho, S.L., Ahn, J.H., Kim, K., Chung, S.I., Lim, I. & Kim, W. (2006) Genetic variation in the NSP4 gene of human rotavirus isolated in Seoul. *J Bacteriol Virol* **36**:79-87.
Colombian northern coast. *Intern Microbiol*, **7**:113–120
- Costa, C., Candeias, J.A.N. & Capeletti, E.L.L. (1990) Eletroferótipos de rotavirus em crianças com e sem quadros de gastroenterite. *Rev Saúde Públ*, **24**:152-155.
- Echeverria, P., Blacklow, N.R., Cukor, G.G., Vibulbandhitkit, S., Changchawalit, S. & Boonthai, P. (1983) Rotavirus as a cause of severe gastroenteritis in adults. *J Clin Microbiol*, **18**:663-667.
- Estes, M.K. & Cohen J. (1989) Rotavirus gene structure and function. *Microbiol Rev*, **53**:410-449.
- Herring, A.J., Inglis, N.F., Ojeh, C.K., Snodgrass, D.R. & Menzies, J.D. (1982) Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. *J Clin Microbiol*, **16**:473-477.
- Iijima, Y., Iwamoto, T., Nukuzuma, S., Ohishi, H., Hayashi, K. & Kobayashi, N. (2006) An outbreak of rotavirus infection among adults in an institution for rehabilitation: long-term residence in a closed community as a risk factor for rotavirus illness. *Scand J Infect Dis*, **38**: 490-496.

Iturriza-Gómara, M., Anderton, E., Kang, G., Gallimore, C., Phillips, W., Desselberger, U. & Gray, J. (2003) Evidence for genetic linkage between the gene segments encoding NSP4 and VP6 proteins in common and reassortant human rotavirus strains. *J Clin Microbiol* **41**:3566-3573.

Kapikian, A.Z., Hoshino, Y. & Chanock, R.M. (2001) Rotaviruses, p.1787–1834. In Knipe, D.M., Howley, P.M., Griffin, D.E., Lamb, R.A., Martin, M.A., Roizman, B. & Straus, S.E. (ed.), *Fields virology*, 4th ed. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA.

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**:680-685.

Leite, J.P.G., Carvalho-Costa, F.A. & Linhares, A.C. (2008) Group A rotavirus genotypes and the ongoing Brazilian experience - A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, **103**:745-753.

Linhares, A.C. (2000) Rotavirus infection in Brazil: epidemiology and challenges for control. *Cad Saúde Públ*, **16**:629-646.

Mascarenhas, J.D.P., Linhares, A.C., Gabbay, Y.B., Lima, C.S., Guerra, S.F.S., Soares, L.S., Oliveira, D.S., Lima, J.C., Macedo, O. & Leite, J.P.G. (2007) Molecular characterization of VP4 and NSP4 genes from rotavirus strains infecting neonates and young children in Belém, Brazil. *Virus Res*, **126**:149-158.

Matsuno, S., Hasegawa, A., Mukoyama, A. & Inouye S. (1985) A candidate for a new serotype of human rotavirus. *J Virol*, **54**: 623-624.

Maunula, L. & von Bonsdorff, C-H. (2002) Frequent reassortments may explain the genetic heterogeneity of rotaviruses: analysis of Finnish rotavirus strains. *Virology*, **76**: 11793–11800

Modarres, S., Rahbarimanesh, A-A., Karimi, M., Modarres, S., Motamedi-Rad, M., Sohrabi, A. & Nasiri-Oskoi, N. (2008) Electrophoretic RNA genomic profiles of rotavirus strains prevailing among hospitalized children with acute gastroenteritis in Tehran, Iran. *Arch Iranian Med*, **11**: 526 – 531

Munford, V., Souza, E.C., Caruzo, T.A.R., Martinez, M.B. & Rácz, M.L. (2007) Serological and molecular diversity of human rotavirus in São Paulo, Brazil. *Braz J Microbiol*, **38**:459-466.

Parashar, U.D., Gibson, C.J., Bresee, J.S. & Glass, R.I. (2006) Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerg Infect Dis*, **12**:304-306.

Pietruchinski, E., Benati, F., Lauretti, F., Kisielius, J., Ueda, M., Volotão, E.M., Soares, C.C., Hoshino, Y., Linhares, R.E., Nozawa, C. & Santos, N. (2006) 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*, **8**:1241-1249.

Ruiz-Palacios, G.M., Perez-Schael, I., Velazquez, F.R., Abate, H., Breuer, T., et al. (2006) Safety and efficacy of an attenuated vaccine against severe rotavirus gastroenteritis. *N Engl J Med*, **354**:11-22.

- Santos, J.S., Alfieri, A.F., Leite, J.P.G., Skraba, I. & Alfieri, A.A. (2008) Molecular epidemiology of the human group A rotavirus in the Paraná State, Brazil. *Braz Arch Biol Technol*, **51**: 287-294
- Santos, N. & Hoshino, Y. (2005) Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *Rev Med Virol*, **15**: 29-56.
- Santos, N. & Nozawa, C. (1989) Comparação dos testes de AL, ME, e EGPA na detecção de rotavírus em fezes diarréicas de crianças. *Rev Bras Pat Clin*, **25**:117-120.
- Santos, N., Honma, S., Timenetsky, M.C.S.T., Linhares, A.C., Ushijima, H., Armah, G.E., Gentsch, J.R. & Hoshino, Y. (2008) Development of a microtiter plate hybridization-based PCR–enzyme-linked immunosorbent assay for identification of clinically relevant human group A rotavirus G and P genotypes. *J Clin Microbiol*, **46**:462–469
- Saravanan, P., Ananthan, S. & Ananthasubramanian, M. (2004) Rotavirus infection among infants and young children in Chennai, South India. *Indian J Med Microbiol*, **22**:212-221.
- Solberg, O.D., Hasing, M.E., Trueba, G. & Eisenberg, J.N.S. (2009) Characterization of novel VP7, VP4, and VP6 genotypes of a previously untypeable group A rotavirus. *Virology*, **385**:58–67
- Surendran, S. (2008) Molecular changes and pathophysiology. *EXCLI J*, **7**:154-162.
- Urbina, D., Rodríguez, J.G., Arzuza, O., Parra, E., Young, G., Castro, R. & del Portillo, P. (2004) G and P genotypes of rotavirus circulating among children with diarrhea in the
- Vesikari, T., Matson, D.O., Dennehy, P., Van Damme, P., Santosham, M., et al. (2006) Safety and efficacy of a pentavalent human-bovine (WC3) reassortant rotavirus vaccine. *N Engl J Med*, **354**:23-33.
- Wenman, W.M., Hinde, D., Feltham, S. & Gurwith, M. (1979) Rotavirus infection in adults. Results of a prospective family study. *New Engl J Med*, **301**:303-306.
- Yeager, M., Dryden, K.A., Olson, N.H., Greenberg, H.B. & Baker, T.S. (1990) Three-dimensional structure of rhesus rotavirus by cryoelectron microscopy and image reconstruction. *J Cell Biol*, **110**:2133-2144.

APÊNDICES

APÊNDICE I – PROTOCOLO DE TÉCNICAS

A) Clarificação de amostras fecais:

1. Colocar aproximadamente 200 mg da amostra fecal juntamente com tampão fosfato-salina (PBS), pH 7.3, na proporção de 1:10, em tubos 13x100 mm contendo pérolas de vidro.
2. Homogeneizar em agitador de tubos, mantendo-se o material em banho de gelo sempre que possível.
3. Clarificar por centrifugação a baixa rotação (450xg) durante 10 min.
4. Recuperar os sobrenadantes clarificados.
5. Manter o clarificado a -20°C até o seu processamento.

B) Teste de aglutinação do látex e imunocromatografia

Os testes de aglutinação do látex e imunocromatografia foram processados segundo protocolo fornecido pelos fabricantes dos kits:

- ✓ **Para aglutinação do látex:** Virotec-rota[®]. OMEGA DIAGNOSTICS LTD – Escócia e distribuído no Brasil por Biosys Ltda.
- ✓ **Para imunocromatografia:** VIKIA[®] Rota-Adeno. bioMérieux do Brasil.

C) Extração do RNA viral pelo método de fenol-Clorofórmio:

1. Em 400 μl de clarificado fecal tratar com 40 μl dodecil sulfato de sódio (SDS) a 10% e incubar em banho-maria a 37°C por 30 min.
2. Adicionar ao material 400 μl de solução saturada de fenol e clorofórmio (v/v).
3. Agitar por 10 min. a temperatura ambiente e centrifugar a 3.000 g por 10 min.

4. Recuperar cuidadosamente o sobrenadante (fase aquosa), evitando-se colher a interfase, e transferir para outro microtubo. Caso a fase aquosa esteja opalescente, repete-se a extração com a solução de fenol e clorofórmio.
5. Precipitar o RNA com 1 ml de etanol gelado (-20°C) e 40 μl de cloreto de sódio a 20% durante, no mínimo, 18h.
6. Centrifugar a amostra a 15.000xg por 10 min, desprezar o sobrenadante e dessecar o sedimento sob vácuo por 30min.

D) Eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) do ácido nucléico viral:

A EGPA foi realizada de acordo com a técnica de LAEMMLI (1970). As bandas de RNA foram reveladas por impregnação da prata (HERRING *et al.*, 1982).

• Montagem das placas de eletroforese:

1. Utilizar as placas de vidro, espaçadores e pente que devem estar previamente limpos com álcool-eter.
2. Montar as placas de vidro com os espaçadores (inferior e laterais).
3. Colocar grampos nas extremidades, selar as placas com solução de ágar a 2,5% fundido e aguardar até a sua solidificação.
4. Preparar a solução do gel separador, verter entre as placas e adicionar uma camada delgada de *n*-butanol para eliminar as bolhas e assegurar uniformidade.
5. Aguardar a polimerização do gel por aproximadamente 10 a 15 min. a temperatura ambiente.
6. Retirar o *n*-butanol, lavar a superfície do gel com água destilada e retirar excesso d'água com papel de filtro.
7. Adicionar a solução do gel concentrador, colocar o pente para formação das canaletas e aguardar a polimerização do gel.

8. Retirar cuidadosamente o espaçador inferior e o pente.
 9. Fixar as placas na cuba de eletroforese e vedar os pontos de contato entre a placa e a cuba com a solução de ágar.
 10. Adicionar o tampão de corrida nos reservatórios superior e inferior da cuba e aplicar a amostra de RNA no gel.
- **Tratamento da amostra e corrida eletroforética:**
 1. Tratar a amostra de RNA dessecada com 40 µl de tampão dissociante. Caso seja utilizado o clarificado fecal, 40 µl da amostra são tratadas com 20 µl de tampão dissociante.
 2. Incubar em banho-maria a 56°C por 30 min.
 3. Aplicar cuidadosamente as amostras nas canaletas do gel, evitando o extravasamento para as canaletas vizinhas.
 4. Realizar a corrida eletroforética por 2h com intensidade de corrente de 25mA.
 5. Desmontar as placas, remover o gel concentrador e corar o gel separador.
 - **Coloração do gel por impregnação de prata:**
 1. Transferir o gel separador para uma cuba de vidro ou plástico com 50 ml de solução fixadora, mantendo-o sob agitação orbital suave por 30 min.
 2. Lavar o gel três vezes com água destilada.
 3. Colocar o gel em 50 ml de solução corante e deixar sob agitação orbital periódica durante 30 min.
 4. Lavar ligeiramente o gel em água destilada, certificando que a solução de prata foi removida de ambas as faces do gel.
 5. Colocar o gel na solução reveladora, mantendo-o sob agitação até revelação das bandas (em geral de 5 a 10 minutos).
 6. Lavar o gel com água destilada

7. Interromper a revelação transferindo o gel para a solução bloqueadora. O gel pode ser conservado em solução de etanol a 10%.

- **Desidratação e secagem do gel:**

1. Transferir o gel separador, depois de lavado em água destilada, para a solução de metanol a 70% e glicerol a 0,5%.
2. Manter em agitação periódica até que o gel se encolha ao máximo, em geral de 3 à 4h para gel de 7% de acrilamida com 1 mm de espessura. Manter o recipiente fechado para evitar evaporação.
3. Embeber o gel em solução de gelatina, entre folhas de papel celofane previamente lavadas, evitando-se bolhas de ar ou rugas papel celofane.
4. Dessecar em estufa a 37°C ou a temperatura ambiente.

E) Análise das amostras fecais por microscopia eletrônica (ME):

A visualização dos RV pela ME realizou-se com material fecal bruto pelo método super-direto (SANTOS & NOZAWA, 1989).

- **Preparação das grades revestidas com Formvar:**

1. Preparar cerca de 80-90 ml de Formvar a 0,3% no becker e mergulhar aproximadamente 95% de uma lâmina limpa e desengordurada.
2. Retirar a lâmina, deixar o excesso de Formvar escorrer a temperatura ambiente e fazer um corte retangular no Formvar seco (película) com um objeto pontiagudo (bisturi, estilete, ponta de vidro).
3. Encher um recipiente de vidro com água e mergulhar vagarosamente a lâmina com inclinação de cerca de 30°.
4. Observar desprendimento da película de Formvar com auxílio de uma fonte luminosa.

5. Colocar sobre a película grades de cobre, com o lado brilhante para cima (apenas como referência).
 6. Retirar a película com as grades com uma tira de papel de filtro.
 7. Deixar o papel de filtro com as grades secar a temperatura ambiente protegido em placa de petri fechada.
 8. Submeter as grades à sublimação de carbono em metalizador por aproximadamente três segundos.
- **Preparação das amostras fecais para exame por ME:**
 1. Depositar uma gota de água destilada sobre uma lâmina limpa comum de microscopia.
 2. Colocar aproximadamente 25 µl da amostra fecal.
 3. Homogeneizar o material, depositar grades de microscopia recoberta com Formvar/carbono e aguardar por dois minutos.
 4. Retirar o excesso do material fecal em solução com papel de filtro e fixar a amostra pelo calor.
 5. Adicionar aproximadamente 25 µl de fosfotungstato de sódio 2% sobre a grade e deixar por dois minutos. O excesso do contrastante é removido com papel de filtro e o material fixado pelo calor.
 6. Observar as grades ao microscópio eletrônico de transmissão.

F) Genotipagem das amostras por RT-PCR-ELISA:

Os genótipos foram determinados por PCR-ELISA, após obtenção de cDNA, a partir de sondas pré-estabelecidas (SANTOS *et al.*, 2008).

• **Amplificação da RT-PCR e determinação por *Nested*-PCR:**

1. Misturar 5 µl da suspensão de RNA em água ultrapura com 1,0 µl de DMSO, em um microtubo.
2. Aquecer a 97°C/5min. no termociclador para PCR.
3. Baixar a temperatura para 4°C, no termociclador, pelo menos por 1 min.
4. Preparar a solução mãe da transcrição reversa (RT) em um microtubo.

Solução mãe para a transcrição reversa (RT)	Volumes dos reagentes por reação (1x)
Água ultrapura	1,0 µl
Tampão para RT [5x]	2,0 µl
Cloreto de magnésio 2,5 mM	1,2 µl
dNTPs 10mM	0,5 µl
Primers*	0,2 µl
IMPROM-II RT	0,2 µl

*Ver tabela, item XII, no Apêndice II.

5. Adicionar 5 µl da solução mãe da RT, para cada reação, nos tubos contendo as amostras.
6. Colocar as reações no termociclador e programar para RT-PCR:

Anelamento	25°C/2'
Transcrição reversa	42°C/45'
Saturação	4°C

7. Adicionar 60 µl da mistura principal da PCR para reação da VP7 ou 40 µl para reação da VP4 ou NSP4.

Mistura principal para amplificar VP7	Volumes dos reagentes por reação (1x)
Mistura da PCR ¹	59 µl
Primers*	0,5 µl
Taq polimerase	0,5 µl
Total	60 µl

¹Mistura da PCR contém dNTPs 200 µM, MgCl²⁺ 2,5 mM e tampão de PCR 10x.

*Ver tabela, item XII, no Apêndice II.

Mistura principal para amplificar VP4	Volumes dos reagentes por reação (1x)
Mistura da PCR	39,4 µl
Primers*	0,3 µl
Taq polimerase	0,3 µl
Total	40 µl

*Ver tabela, item XII, no Apêndice II.

Mistura principal para amplificar NSP4	Volumes dos reagentes por reação (1x)
Mistura da PCR	39,4 µl
Primers*	0,3 µl
Taq polimerase	0,3 µl
Total	40 µl

*Ver tabela, item XII, no Apêndice II.

8. Colocar as reações correspondentes para cada genótipo no termociclador e correr seguindo o programa da PCR.
9. Para determinação por *Nested-PCR*, após o 1º ciclo, foi retirado 1 µl do amplicon de cada amostra e adicionado o primer NSP4-1a e os primers específicos para cada genótipo (NSP4-Kun-1a, NSP4-Wa-1a, NSP4-RRV-1a). Em seguida, a amostra foi colocada no termociclador seguindo a programação para a PCR.

Aquecer	95°C/2'.
Ciclos da PCR (40x)	94°C/30''
	40°C/1'
	72°C/1:30'
Extensão	72°C/5'
Saturação	4°C

10. Carregar 5µl dos amplicons com 3µl de tampão com azul de bromofenol no gel de agarose contendo brometo de etídio.
11. Correr por aproximadamente 1:30h e analisar a amplificação em transluminador.

- **Detecção por ELISA:**

1. Adicionar 100 µl da solução de estreptavidina em tampão carbonato em cada poço, em placa de 96 escavações de fundo chato.
2. Incubar a placa a 37°C por 1h ou deixar de um dia para o outro a 4°C. A placa pode ser estocada por longos períodos em câmara úmida.
3. Desprezar a solução e lavar três vezes com 200 µl de tampão fosfato-salina Tween-20 (PBS-Tw) morno.
4. Adicionar 5 µl do produto da PCR por poço da placa. Uma reação por genótipo. Para testar VP7, utilizam-se 10 poços (G1-G6, G8-G10 e G12) e para VP4 quatro poços (P[4], P[6], P[8] e P[9]).
5. Incubar a placa por 1h a temperatura ambiente ou deixar de um dia para o outro a 4°C.
6. Desprezar a solução e lavar três vezes com 200 µl de tampão PBS-Tw morno.
7. Adicionar 100 µl da solução desnaturante e deixar agir por 10 min. a temperatura ambiente.
8. Desprezar a solução e lavar três vezes com 200 µl de tampão PBS-Tw morno.
9. Adicionar 100 µl da solução de hibridização com 1 pMol/ml de cada sonda marcada com digoxigenina e incubar por 1h a 52°C.
10. Desprezar a solução e lavar três vezes com 200 µl de tampão PBS-Tw morno.
11. Adicionar 100 µl da solução anti-digoxigenina conjugado com peroxidase diluído em PBS-Tw na concentração final de 10 mU/ml.
12. Incubar a placa por 30min. a 37°C.
13. Desprezar a solução e lavar três vezes com 200 µl de tampão PBS-Tw morno.
14. Adicionar 100 µl do substrato TMB (3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina) e incubar a placa a temperatura ambiente por 5 a 10 min.

15. Bloquear a reação com 100 μ l ácido sulfúrico a 2 M e analisar o resultado em absorbância a 450 nm.

APÊNDICE II – LISTA DE SOLUÇÕES**I. TAMPÃO FOSFATO-SALINA (PBS):**

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

II. TAMPÃO FOSFATO-SALINA/TWEEN-20 (PBS-Tw):

Fosfato dibásico de sódio (anidro).....	0,91 g
Fosfato monobásico de potássio	0,12 g
Tween-20	0,20 ml
Água destilada q.s.p.....	1000 ml

III. MISTURA FENOL/CLOROFÓRMIO (V/V):

Fenol bidestilado.....	25,0 ml
Clorofórmio	25,0 ml

IV. DODECILSULFATO DE SÓDIO A 10% (SDS):

Dodecilsulfato de sódio	8,0 g
Água destilada q.s.p.....	1000 ml

V. CLORETO DE SÓDIO A 20%:

Cloreto de sódio	2 g
Água destilada q.s.p.....	10 ml

VI. ÁGAR VEDANTE 2,5%:

Ágar	2,5 g
Água destilada q.s.p.	100 ml

VII. PARA ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA:

A. Solução de acrilamida/bisacrilamida: (50% acrilamida; 1,3% bisacrilamida):

Acrilamida	50,0 g
N,N'-metileno-bis-acrilamida.....	1,3 g
Água destilada q.s.p.	100 ml

B. Tampão para o gel separador: ([4x]; 1,5 M Tris/HCl, pH 8.8):

Tris-(hidroximetil)-aminometano	18,17 g
Água destilada q.s.p.	100 ml

C. Tampão para o gel concentrador: ([4x]; 500 mM Tris/HCl, pH 6.8):

Tris-(hidroximetil)-aminometano	6,06 g
Água destilada q.s.p.	100 m

D. Solução de persulfato de amônio 2%:

Persulfato de amônio	2 g
Água destilada q.s.p.	100 ml

E. Tampão eletrostático para reservatório: ([4x]; 100 mM Tris/HCl, pH 8.3; 830 mMGlicina):

Tris-(hidroximetil)-aminometano	12,11 g
Glicina.....	62,3 g
Água destilada q.s.p.	1000 ml

F. Tampão dissociante para RNA: (62,5 mM Tris/HCl, pH 6.8; 5 M uréia; 5% 2-mercaptopetanol; 3% dodecilsulfato de sódio; 0,01% azul de bromofenol; 10% glicerol):

Uréia	3 g
β-mercaptoetanol	0,5 ml
Dodecilsulfato de sódio a 10%	3 ml
Tris-(hidroximetil)-aminometano a 500 mM.....	1,25 ml
Azul de bromofenol a 1%	0,1 ml
Glicerol	1 ml
Água destilada q.s.p.....	10 ml

VIII. GEL DE POLIACRILAMIDA:

A. Gel separador 7% poliacrilamida (pH 8.8):

Solução A.....	0,8 ml
Solução B.....	1,5 ml
Água destilada	3,45 ml
Solução D.....	0,175 ml
TEMED.....	5 µl

B. Gel concentrador 3,5% poliacrilamida (pH 6.8):

Solução A.....	0,25 ml
Solução C.....	0,82 ml
Água destilada	2,1 ml
Solução D.....	0,1 ml
TEMED	5 µl

IX. PARA O TRATAMENTO DO GEL DE POLIACRILAMIDA:

A. Solução de fixação: (10% etanol; 2% ácido acético):

Etanol.....	10 ml
Ácido acético	2 ml

- Água destilada q.s.p..... 100 ml
- B. Solução de impregnação: (11 mM nitrato de prata):
- Nitrato de prata 1,87 g
- Água destilada q.s.p..... 100 ml
- C. Solução de revelação: (750 mM hidróxido de sódio; 2% formol):
- Hidróxido de sódio 3 g
- Formaldeído (2%)..... 2 ml
- Água destilada (dH_2O) q.s.p..... 100 ml
- D. Solução de parada: (5% ácido acético):
- Ácido acético 5 ml
- Água destilada q.s.p..... 100 ml
- E. Solução de conservação: (5% etanol):
- Etanol..... 10 ml
- Água destilada q.s.p..... 100 ml
- F. Solução de desidratação: (70% metanol; 0,5% glicerol):
- Metanol..... 70 ml
- Glicerol 0,5 ml
- Água destilada q.s.p..... 100 ml
- G. Solução de gelatina a 5%:
- Gelatina incolor 5 g
- Água destilada q.s.p..... 100 ml
- X. PARA A MICROSCOPIA ELETRÔNICA:
- A. Solução de Formvar a 3%:
- Resina polivinil (Formvar 15/95) 3 g

Clorofórmio q.s.p..... 100 ml

B. Solução corante eletrônico fosfotungstato de sódio a 2%: (pH 6.3):

Ácido fosfotúngstico..... 2 g

Água destilada q.s.p..... 100 ml

XI. PARA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE:

A. Tampão Tris-Borato-EDTA (TBE): ([10x]; 890 mM Tris/HCl, pH 8.3; 890 mM ácido bórico; 25 mM EDTA):

Tris-(hidroximetil)-aminometano 108 g

Ácido bórico 55 g

Ácido etilenodiaminotetracético 9,3 g

Água destilada q.s.p..... 1000 ml

B. Tampão para amostra da amostra de cDNA:

Sacarose 2 g

Azul de bromofenol 0,05%..... 0,4 ml

Água destilada q.s.p..... 10 ml

C. Tampão eletrostático para o reservatório:

TBE 10x..... 150 ml

Água destilada q.s.p..... 1000 ml

XII. GEL DE AGAROSE:

Agarose 1,2 g

Brometo de etídio 5 µl

TBE 0,5x..... 100 ml

XIII. PRIMERS:

Nome do primers	Sequência	Posição	Genótipos
Beg9 (+)	GGC TTT AAA AGA GAG AAT TTC CGT CTG G	1–28	VP7
End9 (-)	GGT CAC ATC ATA CAA TTC TAA TCT AAG	1036– 1062	VP7
Con2 (-)	ATT TCG GAC CAT TTA TAA CC	887–868	VP4
Con3 (+)	TGG CTT CGC TCA TTT ATA GAC A	11–32	VP4
NSP4-1a (+)	GGC TTT TAA AAG TTC TGT TCC G	1–12	NSP4
NSP4-2b (-)	GGT CAC ATT AAG ACC GTT CC	750–731	NSP4
NSP4-Kun-1a (+)	ATT GAT AGT GCG ATC GAC TGG	439–460	NSP4-A
NSP4-Wa-1a (+)	GGC TGG ATA TAA AGA GCA GG	286–306	NSP4-B
NSP4-RRV-1a (+)	AAC GAT TGG GCT GAA AGG TG	508–528	NSP4-C

XIV. PARA ELISA:

- A. Tampão Carbonato: (pH 9.6; 15 mM Carbonato de sódio; 35 mM Bicarbonato de sódio):

Carbonato de sódio 1,23 g
 Bicarbonato de sódio 2,94 g
 Água destilada q.s.p. 1000 ml

- B. Solução desnaturante: (100 mM Hidróxido de sódio, 0,1% Tween 20):

Hidróxido de sódio 4 g
 Tween 20 1 ml
 Água destilada q.s.p. 1000 ml

- C. Solução de hibridização: (100 mM Tris-HCl, pH 6.5; 300 mM Cloreto de sódio; 10 mM EDTA; 0,1% Tween 20):

Tris-(hidroximetil)-aminometano 12,11 g
 Cloreto de sódio 17,53 g
 Ácido etilenodiaminotetracético 2,92 g
 Tween 20 1 ml
 Água destilada q.s.p. 1000 ml

D. Solução de ácido sulfúrico 2M:

Ácido sulfúrico P.A..... 107,4 ml

Água destilada q.s.p..... 1000 ml