



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

EDUARDO PIETRUCHINSKI

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
ROTAVÍRUS HUMANO NA CIDADE DE
PONTA GROSSA-Pr.**

LONDRINA
2004

EDUARDO PIETRUCHINSKI

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
ROTAVÍRUS HUMANO NA CIDADE DE
PONTA GROSSA-Pr.**

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. Dr Carlos M. Nozawa

LONDRINA
2004

EDUARDO PIETRUCHINSKI

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
ROTAVÍRUS HUMANO NA CIDADE DE
PONTA GROSSA-Pr.**

COMISSÃO EXAMINADORA

Carlos M. Nozawa

Álvaro Manuel Rodrigues Almeida

Jacinta Sanchez Pelayo

Londrina, 22 de dezembro de 2004.

*Para Mônica, Amanda e Daniel, pelo
amor que se renova todo dia.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Carlos Nozawa pela oferta, seguida de orientação, paciência e amizade em todos os momentos.

À Prof^ª. Rosa Elisa C. Linhares, uma amiga com ensinamentos, conselhos e disposição.

À Prof^ª Jacinta Sanches Pelayo pela amizade, apoio e prestatividade.

À todos os professores do Programa de Mestrado em Microbiologia pelo conhecimento transmitido.

Aos amigos Flávio Lauretti e Fabrício Benatti, companheiros em todos os momentos.

Aos colegas de Mestrado: Bruno, Cíntia, Custódio, Fabiane, Janaína, Maria, Marie, Milena, Pâmela, Patrícia, Rafaela, Rita e Rubens pelo apoio, incentivo e amizade.

Aos colegas de laboratório Janaína, Rafaela, Frank, Newton e Sérgio pela colaboração e partilha dos conhecimentos.

Às minhas sócias do Laboratório Pontagrossense de Análises Clínicas, Josiane, Jeanine e Márcia, pela amizade, suporte, incentivo e conselhos.

Ao pesquisador do Instituto Adolfo Lutz-SP, Jonas José Kisielius MsC, que com simplicidade, amizade e extrema competência iniciou-me em técnicas de Microscopia Eletrônica.

À Prof^ª. Dr^ª. Norma Sueli de Oliveira Santos e doutorandos Eduardo Volotão e Caroline Soares do Laboratório de Virologia da Universidade Federal do Rio de

Janeiro que, durante o período necessário, disponibilizaram seus conhecimentos e colaboraram de forma decisiva para a conclusão deste trabalho.

Ao Dr. Paulo Vanat (Laboratório Clinipon) pela cessão de parte das amostras utilizadas nesta pesquisa.

A Rosilda, secretária da pós-graduação, pela competência aliada a grande simpatia.

A Valdelice dos Santos pelo apoio técnico.

A CAPES e a UEL pelos recursos técnicos e financeiros.

PIETRUCHINSKI, Eduardo. **Detecções e caracterização molecular de Rotavirus humana na cidade de Ponta Grossa – Paraná** 2004. 78 f.. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) Universidade Estadual de Londrina – UEL . Londrina.

RESUMO

A gastroenterite é uma das doenças mais freqüentes no mundo com alto grau de morbidade e mortalidade em países em desenvolvimento. Estima-se que a diarréia aguda seja responsável por um terço de todas as hospitalizações de crianças abaixo de 5 anos, acarretando alto custo para a sociedade. Entre os agentes virais, o rotavírus é a maior causa de diarréia. O diagnóstico e o estudo do vírus são importantes para o controle da doença. Neste estudo, foi avaliado o envolvimento do vírus na população da cidade de Ponta Grossa. Para este propósito utilizaram-se os seguintes testes: aglutinação do látex (AL), imunocromatografia (ICG), eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA), microscopia eletrônica direta (MED), imunoeletromicroscopia (IME) e reação em cadeia de polimerase associada à transcrição reversa (RT-PCR). Duzentas e cinquenta e uma amostras fecais de indivíduos com idade entre 0 e 72 anos, com sintomas de diarréia e coletadas entre maio e agosto de 2003 foram analisadas neste estudo. Setenta e uma (28,3%) amostras foram positivas para rotavírus do grupo A, sendo que só o grupo A foi detectado. Crianças abaixo de 5 anos apresentaram o maior índice de positividade (21,9%). Sessenta e uma amostras foram testadas por RT-PCR sendo o genótipo G1P[8] o mais freqüente. Apenas uma amostra apresentou o genótipo G12P[9] sendo esta a primeira detecção deste genótipo no Brasil.

Palavras-Chave: Rotavirus. Gastroenterite. Genótipo

PIETRUCHINSKI, Eduardo. **Detection and molecular characterization of rotavirus from children and adults in the city of Ponta Grossa, Brazil.** 2004. 78 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) Universidade Estadual de Londrina – UEL . Londrina.

ABSTRACT

Gastrointestinal diseases are one of the most frequent health problems worldwide, showing high rates of morbidity and mortality especially in developing countries. In addition, acute diarrheas causes an estimated one-third of all hospitalizations per year in children younger than 5 years of age, carrying a heavy cost . Among viral agents responsible for gastroenteritis, rotaviruses are the main cause. The diagnosis and the study of the virus itself are important for the control of the diarrheal disease. In this study, the incidence of the virus in the population of Ponta Grossa city was evaluated. For this purpose, the following tests were used: latex agglutination (LA), immunochromatography (ICG), electrophoresis in polyacrylamide gel (PAGE), direct electron microscopy (DEM), immune electron microscopy (IEM) and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Stool samples were collected from 251 individuals with age ranging from 0 to 72 years old suffering from acute diarrhea , over a period of May to August 2003. The results demonstrated that 71 fecal samples (28,3%) were positive to group A rotavirus (only group A was detected). The most frequently affected were children under 5 years of age(21,9%). Among 61 fecal samples rotavirus positive submitted to RT-PCR genotyping, only one was identified as G12P[9] being this the first report in Brazil.

Key-words: Rotavirus. Gastroenteritis. Genotyping

LISTA FIGURAS

Figura 1 - Estimativa dos agentes etiológicos na diarreia severa que requeiram hospitalização de crianças	12
Figura 2 - Aspectos da arquitetura do rotavírus	16
Figura 3 - EGPA do genoma de cepas de rotavírus demonstrando os diferentes padrões de mobilidade dos segmentos do RNA viral.....	17
Figura 4 - Principais aspectos do ciclo de replicação do rotavírus (ESTES, 1996).....	23
Figura 5 - Diagrama esquemático do padrão de migração eletroforético do RNA de cepas que infectam humanos e animais entre os 7 grupos de rotavírus	29
Figura 6 - Eletroforese em gel de poliacrilamida, do RNA viral após extração com fenol-clorofórmio.....	30
Figura 7 – Partículas de rotavírus (amostra HL01). Observação após preparação direta do material fecal, cujo homogenato foi contrastado com 100µl de fosfotungstato de potássio a 2%. Barra: 200nm.....	31
Figura 8 – Células LLC-MK ₂ (Controle).	32
Figura 9 – Células LLC-MK ₂ apresentando efeito citopático causado por rotavírus (amostra HL014)	32
Figura 10 – Eletroforese em gel de agarose do produto da PCR para VP7.....	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Constituição genômica, proteínas e respectivas massas moleculares do Rotavírus.....	15
Tabela 2 – Distribuição da amostragem por faixa etária de 0-5 anos e 6-72 anos e respectiva positividade	29
Tabela 3 - Resultados da genotipagem de sessenta e uma amostras fecais obtidas na cidade de Ponta Grossa, entre Maio e Agosto de 2003, a partir de pacientes ambulatoriais e nosocomiais com sintomas de diarreia.....	35
Tabela 4 – Resultados da genotipagem de rotavírus, por RT-PCR, em pacientes internados com gastroenterite viral, Ponta Grossa – Pr. 2003	36
Tabela 5 – Compilação dos dados e resultados obtidos	37

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REFERENCIAL TEORICO	14
2.1 Propriedades Gerais Dos Rotavírus	14
2.3 Classificação E Incidência Dos Rotavírus	18
2.4 Patogenia.....	19
2.5 Replicação Dos Rotavírus.....	21
2.6 Vacina	24
2.7 diagnóstico laboratorial.....	25
3 OBJETIVO	28
4 RESULTADOS	29
REFERÊNCIAS	39
ANEXOS	47
ANEXO 1 – Técnicas	48
ANEXO 2 – Soluções e Reagentes.....	56

1 INTRODUÇÃO

A diarreia infecciosa aguda é uma das causas mais comuns de morbidade e mortalidade em crianças até dois anos de idade, em países em desenvolvimento. Anualmente, aproximadamente 1 bilhão de casos identificados resultam em 4 a 5 milhões de mortes (ARIAS et al., 2002). O acometimento dessa enfermidade, entre idosos, também tem um significado importante na Saúde Pública (LUNDGREN et al., 2001). Além impacto significativo sobre a saúde coletiva, ocorrem também substanciais perdas econômicas devido às hospitalizações e ao tempo perdido pelos familiares durante o tratamento dos acometidos (HELLARD et al., 2000; GLASS et al., 1996).

A diarreia pode ser causada por diferentes patógenos incluindo parasitas, bactérias e vírus (Fig. 1), tendo estes merecido especial atenção nos últimos anos (LUNDGREN et al., 2001). O motivo deste interesse é, provavelmente, devido ao envolvimento cada vez maior dos vírus nas patologias humanas, além da dificuldade na detecção destes agentes, independente do meio em que se encontram (METCALF et al., 1995). Além disso, os vírus entéricos humanos não são removidos eficientemente pelos procedimentos em estações de tratamento da água, devido à sua estabilidade na água, e nos sedimentos e esgotos (EGGLESTONE et al., 1999).

O rotavírus e o adenovírus do grupo F (tipos 40 e 41) têm sido identificados como a causa mais comum de gastroenterite em crianças, enquanto que o calicevírus, como o vírus Norwalk (NLV) está comumente associado a surtos epidêmicos de gastroenterite em adultos e crianças (O'NEILL et al., 2002).

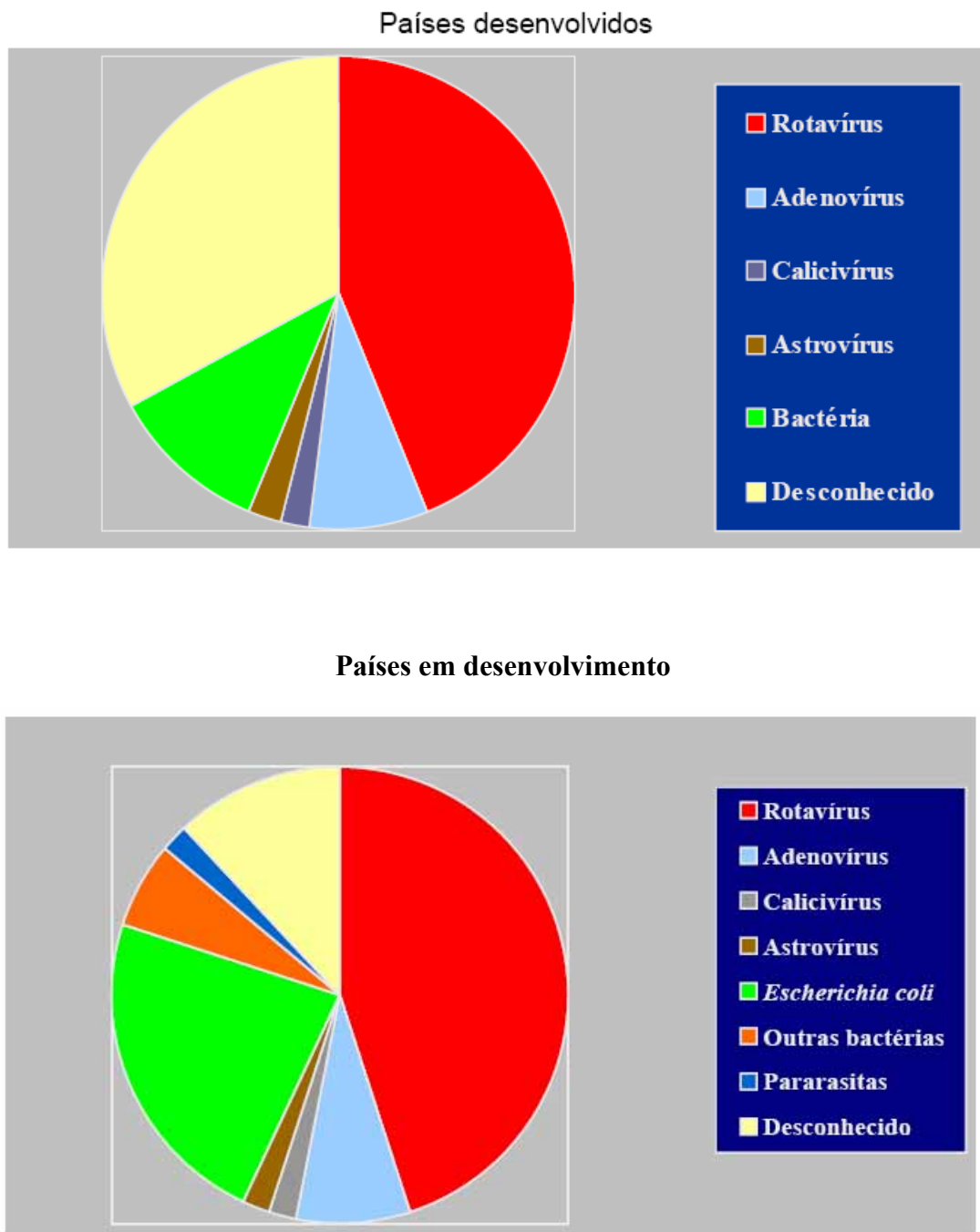


Figura 1 Estimativa dos agentes etiológicos na diarreia severa que requeram hospitalização de crianças (KAPIKIAN & CHANOCK, 1996).

O rotavírus, identificado como patógeno humano na década de 70 (BISHOP et al., 1973; FLEWETT et al., 1973), é o agente etiológico mais comumente associado da diarreia em crianças entre 6 a 24 meses de idade (BRANDT et al., 1979;

KAPIKIAN & CHANOCK, 1996). Estima-se que ocorram cerca de 870.000 mortes por ano nos países em desenvolvimento (ARIAS et al., 2002). É estimado que, anualmente nos Estados Unidos, 500.000 crianças sejam atendidas devido à diarreia causada pelo rotavírus. Destas, 10% são hospitalizadas e nos casos mais severos há relatos de morte (JONES et al., 2003). Cerca de um bilhão e meio de dólares são gastos direta ou indiretamente com as infecções pelo rotavírus (OFFIT, 1998).

Na medicina veterinária, o vírus também é importante devido ao impacto causado em várias criações de interesse econômico, devido, principalmente, à baixa conversão alimentar resultante da diarreia (RAMOS et al., 2000).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Propriedades Gerais Do Rotavírus

O termo rotavírus é derivado da palavra latina *rota*, que significa roda, e deve-se ao aspecto morfológico da partícula viral quando observada em microscópio eletrônico (FLEWETT et al., 1974). A partícula viral íntegra tem aproximadamente 75 nm de diâmetro, não possui envelope e o capsídeo, de simetria icosaédrica, é constituído por três camadas (ESTES, 1996). O gênero *Rotavírus* é um dos 9 gêneros da família *Reoviridae* que apresentam propriedades morfológicas e bioquímicas em comum (ICTV, 2004). São caracterizados por genoma composto com 11 segmentos de RNA de fita dupla (fd). A massa molecular dos segmentos genômicos varia de 2×10^5 a $2,2 \times 10^6$ daltons e a massa total da partícula é estimada entre 11 e 14×10^6 daltons (ESTES, 1996). Os dez primeiros fragmentos são monocistrônicos, e expressam seis proteínas estruturais (VP1-VP4, VP6 e VP7), e quatro proteínas não-estruturais (NSP1 a NSP4), enquanto o décimo primeiro segmento expressa duas proteínas não estruturais (NSP5 e NSP6) (LUNDGREN et al., 2001; JAYARAM et al., 2004) (Tab. 1).

O capsídeo externo é constituído por duas camadas de proteínas estruturais, a VP4 e VP7, e o capsídeo interno pela VP6. Codificada pelo quarto segmento genômico, a VP4 é uma hemaglutinina que se apresenta sob a forma de dímeros, representada por 60 espículas e que se ligam à membrana da célula hospedeira. Sensível à ação de proteases, a VP4 ao ser clivada, produz dois peptídeos: VP5* e VP8*. A VP7 é uma glicoproteína codificada pelo sétimo, oitavo ou nono segmento genômico,

dependendo da cepa. O capsídeo interno é constituído por 260 trómeros de VP6 (codificada pelo sexto segmento genómico) e se apresenta sob a forma radial. O cerne viral é delimitado por uma estrutura que consiste de 60 dímeros de VP2, com função ligante de RNA e apresenta forma hexagonal. O cerne é constituído de VP1 com função transcritase/replicase ou RNA polimerase, VP3 com função guanililtransferase, além dos 11 segmentos genómicos (ESTES, 1996).

Tabela 1- Constituição genómica, proteínas e respectivas massas moleculares do Rotavírus (SA-11) (ESTES, 1996; JAYARAM et al., 2004)

Segmento genómico	Proteína	Massa Molecular(kDa)
1	VP1	125
2	VP2	94
3	VP3	88
4	VP4 (VP5* + VP8*)	88
5	NSP1	53
6	VP6	41
7	NSP3	34
8	NSP2	35
9	VP7	38
10	NSP4	28
11	NSP5 – NSP6	26

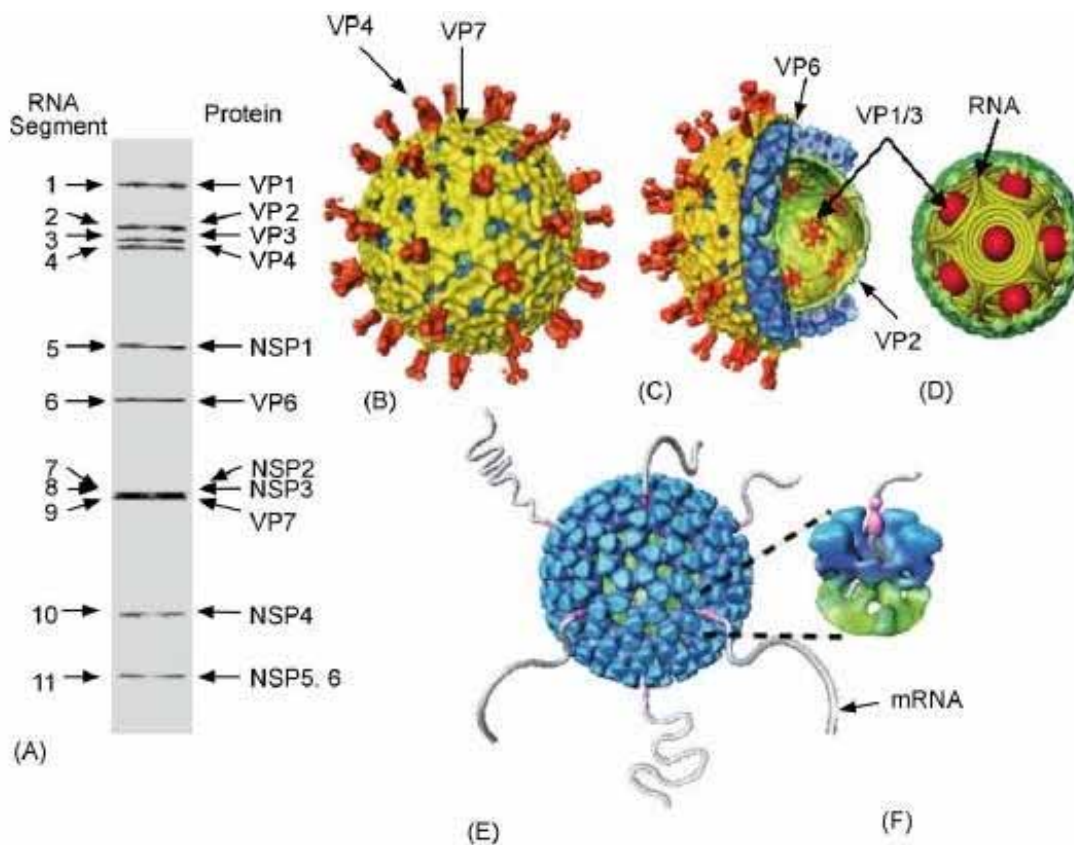


Figura 2 – Aspectos da arquitetura do rotavírus. (A) Gel de poliacrilamida com os 11 segmentos de RNAdf e as proteínas codificadas pelos respectivos segmentos. Os segmentos relativos a cada gene são numerados à esquerda e as proteínas que eles codificam são indicadas à direita. (B) Reconstituição da partícula de rotavírus. A proteína espicular VP4 está em laranja e a VP7 em amarelo. (C) Corte da partícula viral mostrando a proteína VP6 em azul e VP2 em verde. As enzimas transcricionais ancoradas a VP2 são mostradas em vermelho. (D) Representação esquemática da organização do genoma viral. Os segmentos do genoma são representados como espirais cônicas invertidas ao redor das enzimas transcricionais (como bolas vermelhas) dentro da camada de VP2 (em verde). (E e F) Modelo da partícula viral com duas camadas, reconstruído a partir de Cryo-EM. A transcrição endógena resulta em liberação simultânea do RNAm transcrito através de canais localizados nos vértices do icosaedro da partícula com dupla camada (JAYARAM et al., 2004).

A eletroferotipagem é um método acessório empregado na taxonomia, de acordo com os padrões de disposição dos 11 segmentos de RNAdf (DESSELBERG, 1996). A distribuição eletroforética dos segmentos do genoma da maioria dos rotavírus obedece ao padrão definido em quatro classes. Quatro segmentos grandes (classe I, segmentos 1-4), 2 médios (classe II, segmentos 5-6), 3 pequenos (classe III, segmentos

7-9) e 2 segmentos ainda menores (classe IV, segmentos 10-11) que são evidenciados pela eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) (TANIGUSHI & UROSAWA, 1995; KAPIKIAN & CHANOCK, 1996).

A maioria dos rotavírus pertence ao grupo A, na disposição anteriormente definida como 4-2-3-2. A eletroferotipagem permite ainda a distinção entre cepas de padrão super curto (SS), curto (S) e longo (L), referente à mobilidade dos segmentos 10 e 11 (Fig. 3). Há suposição de que as infecções causadas pelos vírus de padrão S sejam mais graves, porém a maior incidência é de cepas do padrão L (BERN et al., 1992).

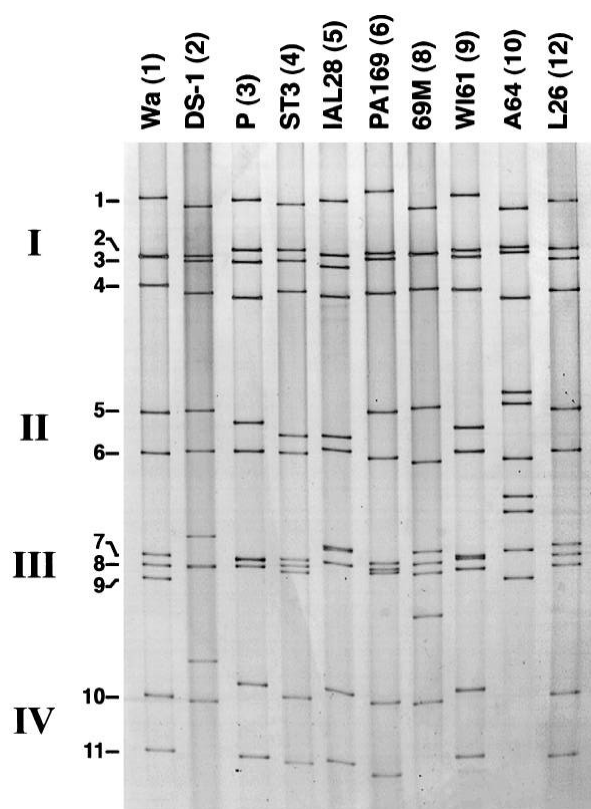


Figura 3. EGPA do genoma de cepas de rotavírus demonstrando os diferentes padrões de mobilidade dos segmentos do RNA viral. Posições 1, 3, 4, 5, 6, 8 e 10 apresentam o Padrão Longo (L); Posição 2 apresenta o Padrão Curto (S); Posição 7 apresenta o Padrão Super Curto (SS); Posição 9 apresenta cepa isolada de uma criança imunocomprometida com infecção crônica por rotavírus carregando RNA rearranjado nos segmentos 8, 10 e 11 (KAPIKIAN et al., 2001).

2.2 Classificação e Incidência dos Rotavírus

Os vírus humanos e animais são classificados em múltiplos grupos sorológicos (sorogrupos) onde estão localizados os vários sorotipos. Os grupos ou sorogrupos são definidos pelos testes de imunofluorescência, ensaio imunoenzimático e imunoeletromicroscopia (KAPIKIAN & CHANOCK, 1996). Os grupos, em número de 7, denominados de A até G, são definidos com base no antígeno associado à proteína do capsídeo interno (VP6), codificada pelo segmento 6. Com base na especificidade antigênica das proteínas do capsídeo externo, VP4 e VP7, os vírus do grupo A são classificados ainda em sorotipos. Os sorotipos baseados na especificidade da proteína VP7 (glicosilada) designados de G, são em número de 14 (sorotipos G1 a G14), dos quais 10 foram detectados em humanos. Os sorotipos baseados na especificidade da VP4 são chamados P, devido à sua sensibilidade à protease. Através da análise da sequência do ácido nucléico, da amplificação ou hibridação, foram encontrados até o momento 20 genotipos e 12 sorotipos diferentes de VP4, sendo 8 em humanos (SANTOS, 2002).

Apenas os vírus dos grupos A, B e C foram diagnosticados em humanos (BRIDGER et al., 1986), com predominância do grupo A, em 95% das cepas identificadas (KOSTOUROS et al., 2002). Os rotavírus do grupo A são endêmicos e são as principais causas de gastroenterite aguda em crianças (CHEN et al., 2002). Em contraste, os rotavírus humanos do grupo B foram inicialmente associados com surtos da doença severa em adultos, na China (HUNG et al., 1983). Subseqüentemente, infecções humanas por vírus do grupo B foram reportadas também na Índia (KRISHNAN et al., 1999).

Infecções humanas por rotavírus do Grupo C foram primeiramente reportadas na Austrália (RODGER et al., 1982) sendo em seguida, descritos em casos esporádicos em adultos e crianças em vários países, incluindo Brasil (BROWN et al., 1989; CAUL et al., 1990; OISHI et al., 1993; SOUZA et al., 1998; GABBAY et al., 1999).

2.3 Patogenia

Os rotavírus infectam as células epiteliais das vilosidades do intestino delgado (STARKEY et al., 1986), sendo que as proteínas VP4 e VP7 são as responsáveis pela interação inicial do vírus com a superfície da célula hospedeira (ESTES, 1996). A VP4 foi identificada como o polipeptídeo de ligação viral (CRAWFORD et al., 1994; LUDERT et al., 1996). Esta proteína é clivada pela ação da tripsina em duas sub-unidades (VP5* e VP8*) e esta clivagem é associada com a penetração do vírus na célula (ESTES et al., 1981). A VP7 forma a camada mais externa da partícula viral e interage com a base das espículas de VP4 (SHAW et al., 1993). Embora o papel da VP7, durante a interação inicial do vírus com a célula não esteja claramente definida, tem sido proposto que ela possa determinar as funções da VP4 (BEISNER et al., 1998) e interagir com moléculas da superfície da célula, após a ligação inicial do vírus através das proteínas espiculares (ESTES, 1996).

A diarreia causada pelo vírus é endêmica, com picos de ocorrência durante o inverno, em países tropicais (HO et al., 1988). A transmissão do vírus é feita por via fecal-oral (KAPIKIAN & CHANOCK, 1996). No entanto, considerando-se que

a taxa de infecção é extremamente alta em todo mundo, a despeito dos padrões de higiene, principalmente em países desenvolvidos, tem-se especulado que a transmissão possa ocorrer por via respiratória. A ocorrência de sintomas respiratórios em alguns indivíduos acometidos pela virose e a detecção do antígeno viral na secreção traqueal de crianças reforçam essa hipótese (SANTOS, 2002).

A infecção produz um espectro de respostas que varia de diarreia suave à severa, com intensa desidratação. As manifestações clínicas mais frequentes são diarreia, vômitos, febre, desidratação e dor abdominal (KAPIKIAN & CHANOCK, 1996), sendo a tríade clássica da infecção febre, vômitos e diarreia (OFFIT, 1998).

Infecções subclínicas também podem ocorrer. A falta de patogenicidade de algumas cepas pode estar relacionada a fatores ligados ao hospedeiro como o efeito dos anticorpos oriundos do aleitamento materno ou diferenças de estrutura ou função intestinal em neonatos (BURKE & DESSELBERGER, 1996). Ainda, investigações moleculares de cepas isoladas a partir de neonatos humanos, assintomáticos, mostraram que elas possuem um ou dois alelos distintos de VP4 (GORZIGLIA et al., 1988; DAS et al., 1993; GENTSCH et al., 1993) sugerindo que estes alelos sejam responsáveis pela falta de patogenicidade da cepa (BURKE & DESSELBERGER, 1996). Mutações na glicoproteína não-estrutural NSP4 também têm sido associadas com a alteração da virulência em rotavírus (ZHANG et al., 1998).

2.4 Replicação dos Rotavírus

A replicação dos rotavírus ocorre no citoplasma das células infectadas causando a morte dos enterócitos (células epiteliais do intestino), e tem sido estudada *in vitro* em células MA-104 (linhagem celular fetal derivada de rim do macaco rhesus) e Caco-2 (linhagem celular derivada de carcinoma de cólon humano) (ESTES, 1996).

A proteína VP4 tem funções essenciais na interação inicial entre o vírus e o enterócito, incluindo a ligação ao receptor e posterior penetração da célula. Esta proteína é clivada pela tripsina originando as subunidades VP5* e VP8*, e tem sido demonstrado que este tratamento proteolítico resulta num aumento da infecciosidade dos rotavírus. Estudos recentes têm demonstrado que a entrada do rotavírus na célula é um processo seqüencial com muitas fases e que envolve receptores contendo ácido siálico na fase de ligação inicial e integrinas como $\alpha v\beta 3$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$ durante as subseqüentes fases pós ligação inicial. Neste processo, os domínios da VP8* estão envolvidos em interações com o ácido siálico enquanto a VP5* está envolvida na ligação com as integrinas (JAYARAM et al., 2004). A ligação da VP8* ao ácido siálico não é um passo essencial para todas as cepas de rotavírus. Na maioria das cepas, incluindo as humanas, a entrada é independente de ácido siálico (CIARLET et al., 2001).

O papel da VP7 durante as interações iniciais do vírus com a célula não está ainda definido, mas tem sido proposto que ela pode modular algumas funções da VP4 durante a ligação e o processo de entrada no vírus na célula receptora (PANDO et al., 2002).

Após a penetração, o capsídeo externo é removido nos lisossomos e a fita de RNA de polaridade positiva é traduzida em proteínas virais por ribossomos livres no citoplasma da célula, com exceção das glicoproteínas VP7 e NSP4 que são sintetizadas em ribossomos associados à membrana do retículo endoplasmático. As fitas de RNA do genoma viral são transcritas por uma enzima viral endógena, a RNA polimerase RNA-dependente ou transcritase (VP1). As sub-partículas se agrupam no interior de estruturas denominadas de viroplasma, onde ocorre a montagem das partículas (ESTES, 1996). No viroplasma há a formação de três intermediários de replicação (IR): (1) IR pré-core, formado por VP1, VP3, NSP1 e NSP3, além dos RNAm. (2) IR core, formado por VP1, VP3, NSP2, NSP5 e VP2. (3) IR-VP6, formado por VP1, VP2, VP3, NSP2, NSP5 e VP6.

Após deixar o viroplasma, o IR-VP6 é acrescido da proteína VP4 que, provavelmente, está na forma solúvel fora do viroplasma. A maturação final ocorre no retículo endoplasmático rugoso (RER) num processo dependente de concentração elevada de íons Ca^{++} para a estabilização das proteínas do capsídeo externo. As partículas brotam para dentro do RER, ganhando, transitoriamente, um envelope formado pela membrana do RER. Dentro do RER este envelope é removido num processo coordenado pela NSP4, sendo a VP7 adicionada para completar a morfogênese. O ciclo termina com a liberação da progênie por lise celular (SANTOS, 2002). O ciclo replicativo é rápido, ocorrendo inibição da síntese protéica das células infectadas em aproximadamente 4 horas e o título máximo de vírus é atingido entre 10 a 12 horas após o início da infecção (Fig. 4) (MAcCRAE & FAULKNER-VALLE, 1981).

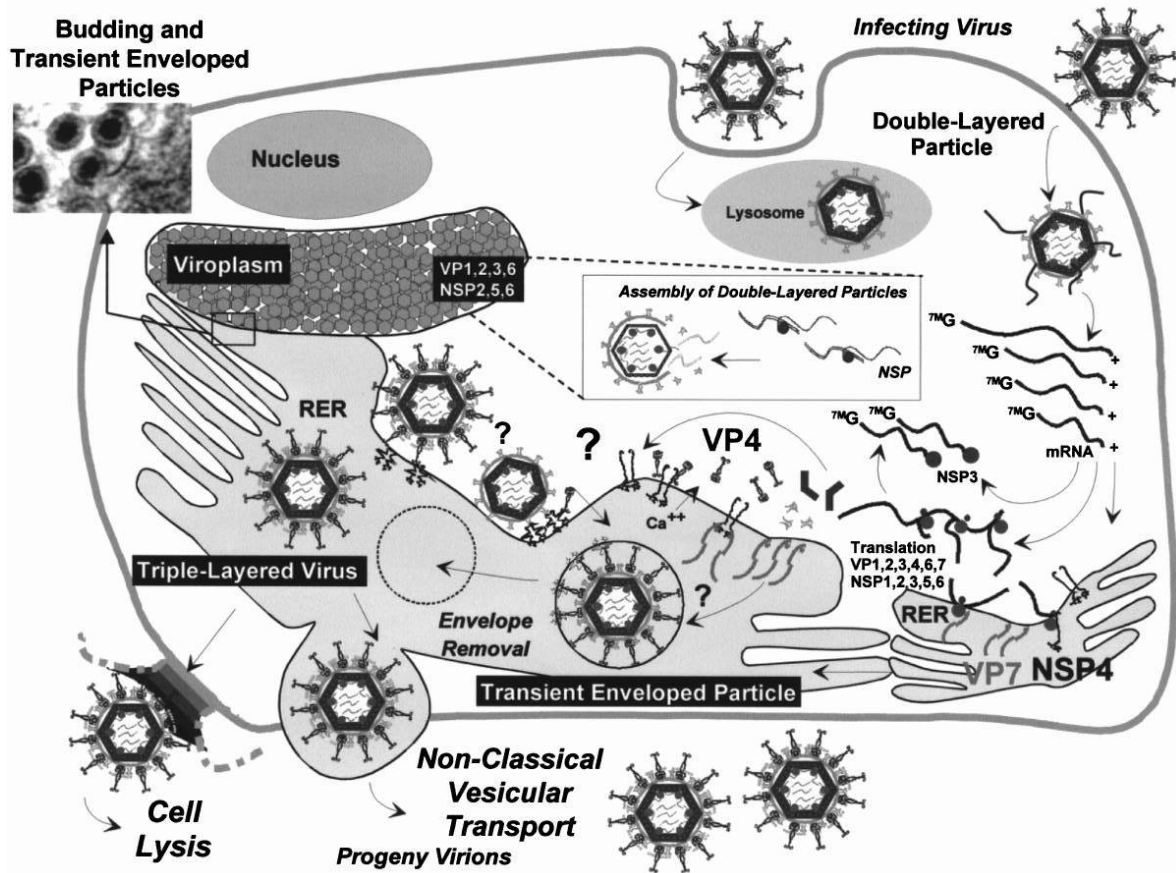


Figura 4 – Principais aspectos do ciclo de replicação do rotavírus (ESTES, 1996).

2.5 Vacina

Pelo fato dos rotavírus terem um importante papel na gastroenterite, e porque níveis elevados de higiene não são capazes de impedir a disseminação das infecções, há um considerável interesse em desenvolver vacinação efetiva e estratégias terapêuticas (ARIAS et al., 2002). O que se espera da vacina é a prevenção da diarreia grave, que pode levar a desidratação e morte, reduzindo nos países em desenvolvimento,

os índices de mortalidade e nos países desenvolvidos, os altos gastos com tratamento e hospitalizações (SANTOS, 2002).

A vacina mais extensivamente avaliada é a formulação tetravalente produzida a partir de recombinantes de rotavírus de macaco rhesus (RRV) que incorporam a VP7 de cada um dos quatros sorotipos mais importantes clinicamente (G1, G2, G3 e G4) (MIDTHUN & KAPIKIAN, 1996). O licenciamento para a utilização da primeira vacina pelo *Food and Drug Administration* (FDA) em 1998 marcou uma importante avanço na prevenção da morbidade associada ao vírus. Entretanto ela foi retirada do mercado em menos de um ano por estar associada à intussuscepção, uma forma rara de bloqueio do intestino encontrada mais freqüentemente em crianças (COSTE et al., 2000).

Outras maneiras de imunização têm sido postuladas, como por exemplo, o caso de batatas transgênicas que expressam VP7 e que depois de ingeridas induzem a produção de altos títulos de IgA secretora (WU et al., 2003) ou obtenção de resposta imune e proteção contra VP6 através de vacinas de DNA aplicadas por injeção intramuscular que levaram a produção de altos títulos de IgG e IgA (YANG et al., 2001). Porém, estas vacinas encontram-se ainda em fase de testes e não foram liberadas para uso humano.

2.6 Diagnóstico Laboratorial

O rotavírus pode ser detectado por uma variedade de técnicas, dentre as quais, microscopia eletrônica (ME), aglutinação com látex (AL), imunocromatografia (ICG), reação em cadeia da polimerase associada à transcrição reversa (RT-PCR) e eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA).

No início, o diagnóstico baseou-se exclusivamente na observação das partículas virais em tecidos ou diretamente nas fezes, através da ME (ADAMS & KRAFT, 1963; BISHOP et al., 1973; FLEWETT et al., 1973; FLEWETT, 1978; NOZAWA et al. 1981).

Após a identificação do rotavírus como um importante causador da gastroenterite aguda, grande esforço foi realizado para encontrar maneiras de cultivá-los *in vitro* (TIETZOVÁ & PETROVICOVÁ, 1994). Diferentemente de rotavírus animais, os de origem humana não se adaptam facilmente em culturas de células e condições especiais são requeridas (WYATT et al., 1980). A introdução da tripsina (ALMEIDA et al., 1978) no inóculo, configurou-se como um importante fator para o cultivo do rotavírus de origem humana na linhagem celular continua MA-104 (SATO et al., 1981; URASAWA et al., 1981). Desde então, esta técnica tem sido usada com bons resultados na adaptação de cepas isoladas a partir de diferentes localizações geográficas e para caracterização antigênica de cepas epidemiologicamente importantes (WARD et al., 1991). Apesar da linhagem celular MA-104 ser citada como a de melhor susceptibilidade para o rotavírus humano (COULSON, 1993; TIETZOVÁ & PETROVICOVÁ, 1994; MENDÉZ et al., 1999), outras linhagens podem ser usadas

como é o caso de LLC-MK₂ (linhagem celular derivada de rim do macaco rhesus) (ESTES et al., 1979).

Utilizando anticorpos poli ou monoclonais, o teste de aglutinação passiva do látex apresenta grande praticidade e especificidade, sendo sua utilização bastante difundida (SANEKATA et al., 1981; DOERN et al., 1986; SANTOS & NOZAWA, 1991).

A eletroferotipagem dos rotavírus usando gel de poliacrilamida é uma técnica amplamente difundida e tem sido utilizada como um método importante na epidemiologia da rotavirose, assim como na taxonomia e identificação de cepas de rotavírus recombinantes (HERRING et al., 1982; SPENCER et al., 1983; MARTIN et al., 1987; TIMENETSKY et al., 1987; KAGA et al., 1994; HOSHINO et al., 1995; SOUZA et al., 1998; JONES et al., 2003; LAURETTI et al., 2003).

A técnica de PCR associada à Transcrição Reversa (RT-PCR) e suas variáveis como *Nested Multiplex* RT-PCR (nmRT-PCR) e Real Time RT-PCR têm sido, por seu elevado grau de sensibilidade e especificidade, utilizadas na detecção e genotipagem de cepas de rotavírus do grupo A, estudos dos rotavírus não-A (particularmente B e C) e outras viroses associadas a gastroenterite (GOUVEA et al., 1990, 1991; ERLICH, 1999; ITURRIZA-GOMARA et al., 1999; KLEIN 2002; YANG et al., 2002; O'NEILL et al., 2002; KOSTOUROS et al., 2002; SOARES et al., 2002; BERECIARTU et al., 2002; MARSHALL et al., 2003).

3 OBJETIVO

Este estudo foi realizado com o intuito de determinar a associação dos rotavírus em casos de diarreia humana no município de Ponta Grossa – Pr, em população infantil e adulta, incluindo-se pacientes ambulatoriais e nosocomiais.

4 RESULTADOS

Foram analisadas 251 amostras fecais obtidas do Laboratório Pontagrossense de Análises Clínicas (LAPAC), situado no Hospital Bom Jesus, e do Laboratório Clinipon. As amostras foram coletadas entre os meses de maio a agosto de 2003, sendo 179 amostras de pacientes na faixa etária entre 0 e 5 anos e 72 entre 6 e 72 anos. Todas as amostras fecais foram inicialmente submetidas à análise pelas metodologias de Aglutinação com Látex (AL) (Rotagen-BioKit-Espanha), Imunocromatografia (ICG)(Bioeasy-Brasil) e Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (EGPA) do RNA viral. Nesta análise obtivemos 71 amostras com resultado positivo para rotavírus (Tab. 2).

Tabela 2 – Distribuição da amostragem por faixa etária de 0-5 anos e 6-72 anos e respectiva positividade.

Faixa etária	Amostragem	Positividade
0-5 anos	179 (71,3%)	55 (77,4%)
6-72 anos	72 (28,7%)	16 (22,6%)
Total	251 (100,0%)	71 (100,0%)

Através da AL e ICG obteve-se, respectivamente, 67 (26,7%) e 70 (27,9%) amostras positivas. No caso da EGPA, a análise consistiu em estudar, inicialmente, as amostras somente clarificadas (sem extração do RNA), sendo que 54 (21,5%) amostras foram positivas. As amostras negativas foram re-testadas após

extração do RNA pelo método de fenol-clorofórmio obtendo-se então um total de 71 (28,3%) amostras positivas.

Todas as amostras que se apresentaram positivas pela EGPA e negativas pelas outras duas metodologias foram re-testadas, em triplicata, para confirmação do resultado. Após esta confirmação elevou-se para 69 (27,5%) o número de amostras positivas por AL, porém, para ICG a positividade foi mantida.

Todas as amostras positivas por EGPA apresentaram eletroferotipo compatível com o grupo A de rotavírus e padrão longo (L) (Fig. 4 e Fig. 5).

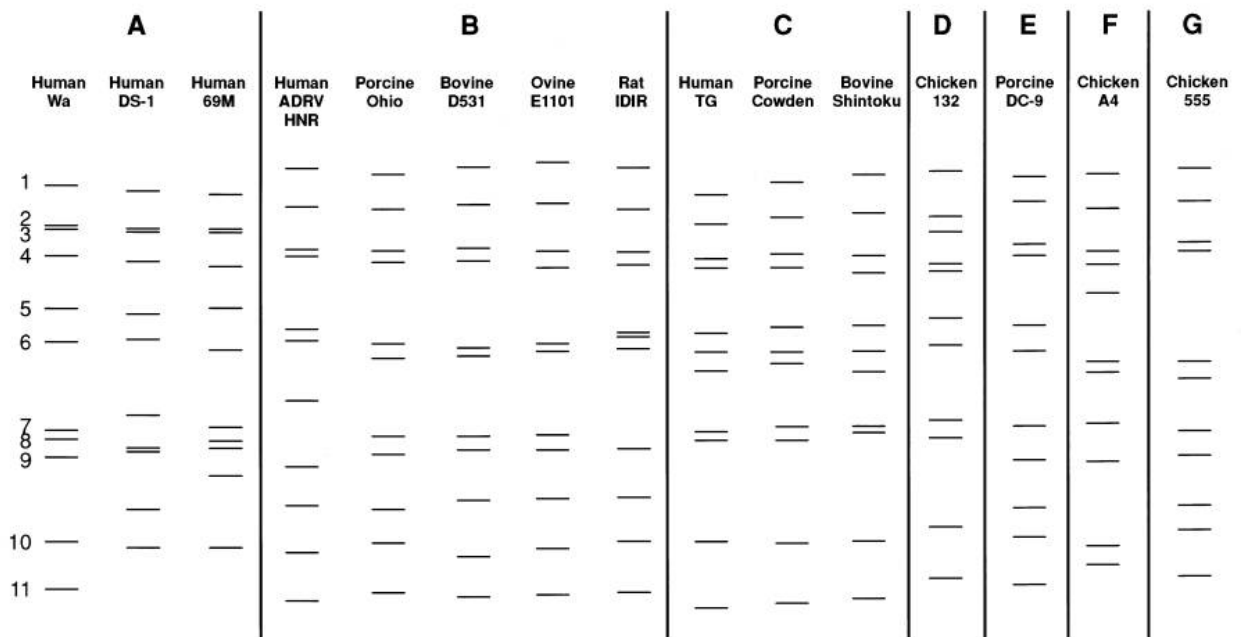


Figura 5 - Diagrama esquemático do padrão de migração eletroforético do RNA de cepas que infectam humanos e animais entre os 7 grupos de rotavírus (KAPIKIAN et al., 2001)

1 2 3 4 5 6 7 8 9

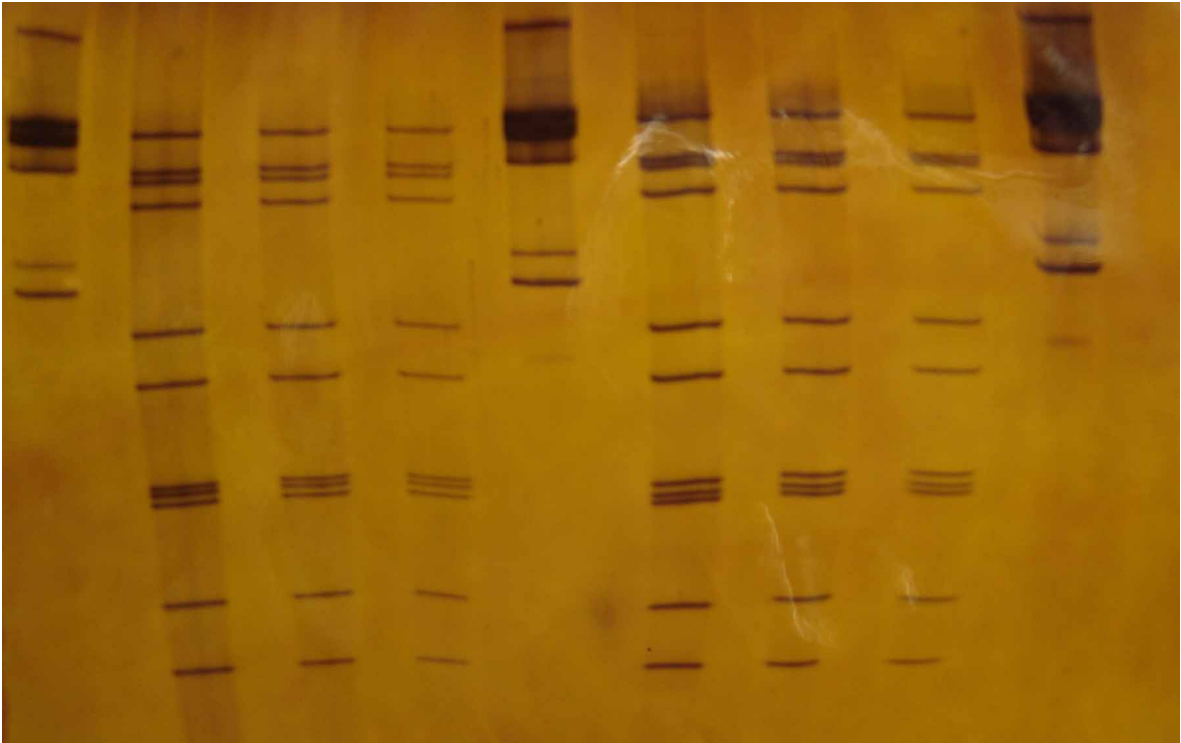


Figura 6 - Eletroforese em gel de poliacrilamida, do RNA viral após extração com fenol-clorofórmio. 40µl dos extratos das amostras fecais foram submetidos à eletroforese, após tratamento com tampão dissociante, durante 2h, sob intensidade de corrente de 25mA e 7% de acrilamida, Gel submetido a coloração com prata. (legenda) Controle: linhas 1, 5 e 9 (fago lambda *HindIII*); Amostras : linha 2 – HL01; linha 3 –HC10; linha 4 – HL14; linha 6 – HC15; linha 7 – HC20 e linha 8 – HC27.

A diferença entre a quantidade inicial de amostras positivas por AL, ICG e EGPA e aquelas que foram analisadas subsequentemente variou de acordo com a disponibilidade de material fecal. Durante o período das análises, todas as amostras foram armazenadas em geladeira em temperatura entre 2°C e 8°C, dentro dos recipientes plásticos utilizados para a coleta pelos pacientes.

Das 71 amostras fecais positivas por EGPA, 65 foram analisadas por Microscopia Eletrônica Direta (MED), sendo que em 54 (83,1%) foi possível a visualização de partículas virais (Fig. 5). As 11 amostras negativas pela MED foram

submetidas à Imunomicroscopia Eletrônica (IME) sendo que 9 apresentaram-se positivas e 2 permaneceram negativas.

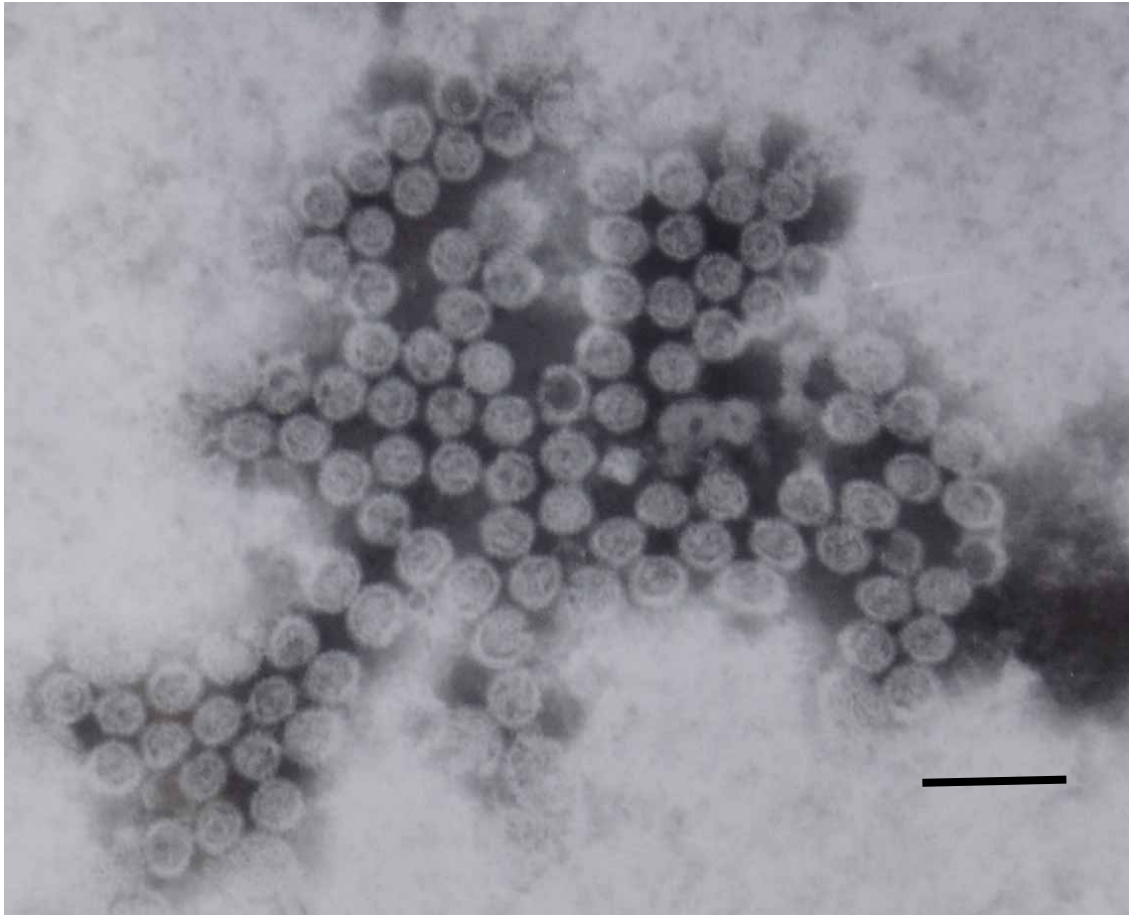


Figura 7 – Partículas de rotavírus (amostra HL01). Observação após preparação direta do material fecal, cujo homogenato foi contrastado com 100µl de fosfotungstato de potássio a 2%. Barra: 200nm.

Sessenta e sete amostras fecais positivas pelas técnicas de AL, ICG e EGPA foram submetidas à inoculação nas linhagens celulares MA-104 e LLC-MK₂ (Fig.6) para o processo de adaptação neste sistema hospedeiro. Após tratamento apropriado as amostras foram inoculadas nas respectivas culturas de células estabelecidas em tubos 13x100mm, em duplicata, e foram observadas por um mínimo de

três passagens. Apenas 14 amostras apresentaram efeito citopático (ECP) característico (Fig.7).

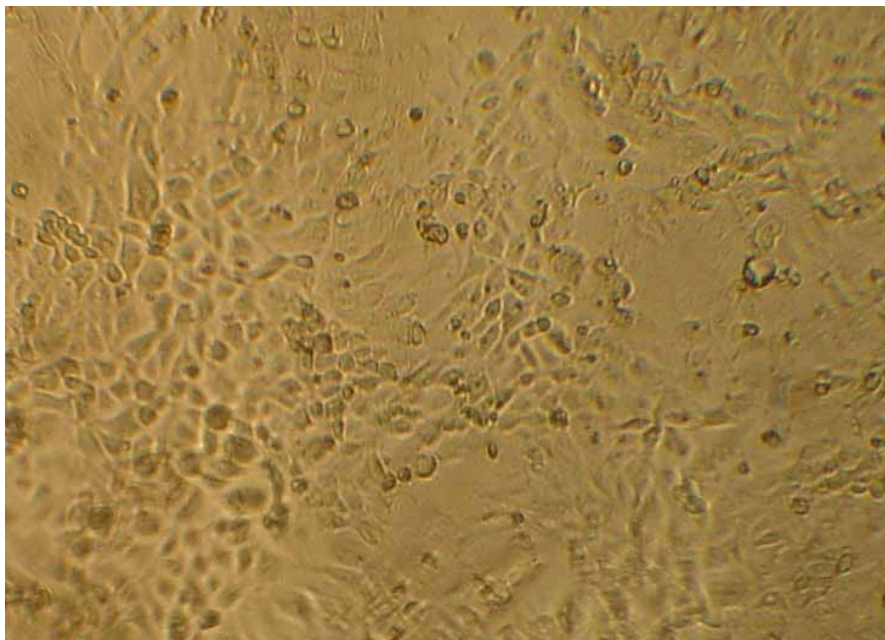


Figura 8 – Células LLC-MK₂ (Controle).

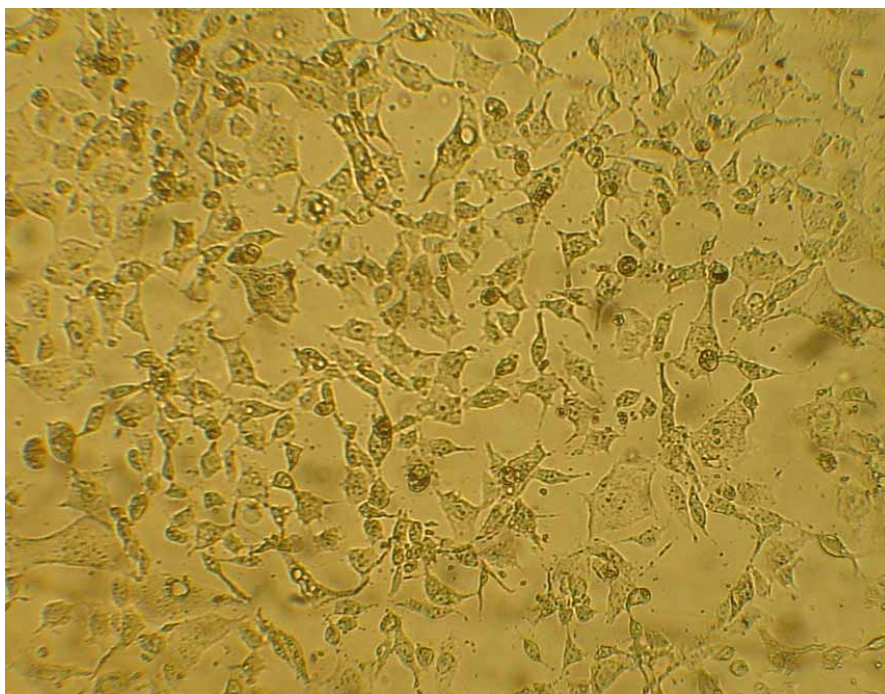


Figura 9 – Células LLC-MK₂ apresentando efeito citopático causado por rotavírus (amostra HL014)

Sessenta e uma amostras fecais positivas para rotavírus foram submetidas a genotipagem pela reação de RT-PCR.

O RNAdf dos rotavírus foi extraído a partir de amostras fecais ou lisados de culturas celulares infectadas pelo uso de isotiocianato de guanidina/hidroxiapatita (GITC/HA) e precipitado com etanol. A RT-PCR para determinação dos genótipos G (VP7) foi realizada com o uso de primers específicos para os genótipos G1-G6, G8-G10 e G11-G12 (SANTOS et al., 2003) (Fig. 7), sendo que para os genótipos P (VP4) foram usados primers específicos para P[4], P[6], P[8], P[9], P[10] e P[11] (ITURRIZA-GÓMARA et al., 2004).

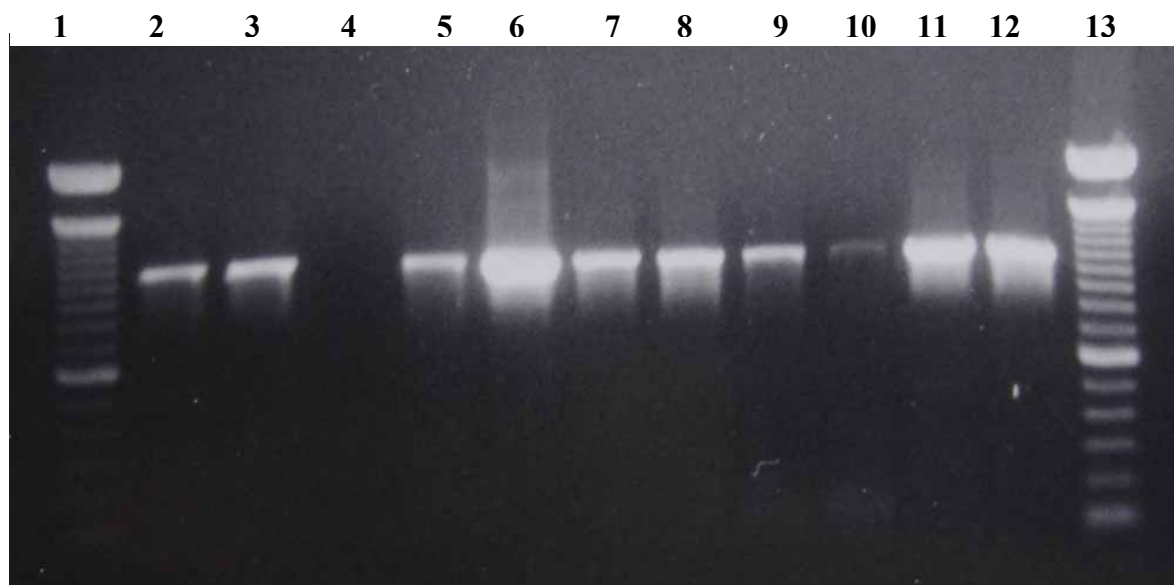


Figura 10 – Eletroforese em gel de agarose do produto da PCR para VP7. 5µl do produto da PCR foram submetidos à eletroforese, durante 50min., sob intensidade de corrente de 120 volts e 1% de agarose. As bandas foram coradas com 0,5µl de brometo de etídio, observadas sob luz UV e fotografadas com filme Polaroid 667. (legenda) Linhas 1 e 13: marcador de massa molecular 100pb. Peso molecular do amplificado: 1062 pb. Amostras: linha 2 – HC10; linha 3 – HL16; linha 4 – HC83 (não amplificou); linha 5 – HC27; linha 6 – HL29; linha 7 – HC30; linha 8 – HC36; linha 9 – HL37; linha 10 – HC39; linha 11 – HC40 e linha 12 – HL44. Todas as amostras amplificadas foram caracterizadas como G1.

As amostras que não amplificaram para VP7 ou VP4 após repetição, foram re-testadas após nova extração do RNAdf viral. Apesar das repetidas tentativas de

amplificação, as amostras HC 83, HC 126 e HC 168 não possibilitaram amplificação. As amostras HL 80 e HC 122 apresentaram amplificação apenas da VP7.

O resultado da genotipagem das 61 amostras fecais testadas é apresentado na tabela 3, sendo importante salientar que uma das amostras (HC91) apresentou a primeira detecção do genótipo G12P[9] no Brasil.

Tabela 3 - Resultados da genotipagem de sessenta e uma amostras fecais obtidas na cidade de Ponta Grossa, entre Maio e Agosto de 2003, a partir de pacientes ambulatoriais e nosocomiais com sintomas de diarreia.

Genótipo	Amostras	Porcentagem
G1P[8]	51	83,7
G9P[8]	1	1,6
G12P[9]	1	1,6
G1	3	4,9
G9	1	1,6
Não genotipadas	4	6,6

As amostras fecais que, após inoculação em cultura de células, apresentaram ECP também foram submetidas à RT-PCR, sendo que o sobrenadante das culturas foi analisado da mesma maneira que as amostras fecais. Tanto as amostras adaptadas em LLC-MK₂ (HL 01, HL 14, HC 15, HC 27, HL 52, HL 73, HL 81, HC 111, HC 115, HC 116, HC 122 e HC 126) como as adaptadas com MA-104 (HL 16, HC 27 e HC 30) não amplificaram.

Das 71 amostras positivas por EGPA, para rotavírus, 5 amostras (7%), foram obtidas de pacientes hospitalizados devido a gastroenterite (Tabela 4).

Tabela 4 – Resultados da genotipagem de rotavírus, por RT-PCR, em pacientes internados com gastroenterite viral, Ponta Grossa – Pr. 2003.

Paciente	Sexo	Idade	Data	Genótipo
HL29	M	2 anos	29/05/03	G1
HL44	F	64 anos	29/05/03	G1P[8]
HL80	M	11 anos	19/06/03	G9
HL81	M	7 anos	19/06/03	G9P[8]
HL141	F	62 anos	13/06/03	G1P[8]

Tabela 5 – Compilação dos dados e resultados obtidos.

Número	Id.	Idade sexo	AL	ICG	EGPA	ME	LLC- MK ₂	MA-104	RT-PCR
1	HL 01	1 f	+	+	+	+	+(4)	-	Insufic.
2	HC 04	4	+	+	+	+	Insufic.	Insufici.	Insufic.
3	HC 10	2 f	+	+	+	+	-	-	G1P[8]
4	HL 14	6 m	+	+	+	+	+(3)	-	Insufic.
5	HC 15	1 m	+	-	+	Insufic.	+(3)	-	Insufic.
6	HL 16	0,10 m	+	+	+	Insufic.	-	+(2)	G1P[8]
7	HC 20	2 f	+	+	+	+	-	-	G1P[8]
8	HC 27	2 m	+	+	+	+	+(1)	+(1)	G1P[8]
9	HL 29	2 m	+	+	+	+	-	-	G1
10	HC 30	1 f	+	+	+	+	-	+(3)	G1P[8]
11	HC 36	1 m	+	+	+	+	-	-	G1P[8]
12	HL 37	1 m	+	+	+	+	-	-	G1P[8]
13	HC 39	3 f	+	+	+	+	-	-	G1P[8]
14	HC 40	2 m	+	+	+	+	-	-	G1P[8]
15	HL 44	64 f	+	+	+	+	-	-	G1P[8]
16	HC 46	4 f	+	+	+	Insufic.	Insufic.	Insufic.	Insufic.
17	HL 47	72 m	+	+	+	+	-	-	G1P[8]
18	HC 49	64 f	+	+	+	+	-	-	G1P[8]
19	HL 52	25 m	+	+	+	Insufic.	+(1)	-	G1P[8]
20	HL 53	2 f	+	+	+	+	-	-	G1P[8]
21	HC 56	3 m	+	+	+	+	-	-	G1P[8]
22	HL 62	1 f	+	+	+	+	-	-	G1P[8]
23	HC 65	2 f	+	+	+	+	-	-	G1P[8]
24	HC 67	1 m	+	+	+	+	-	-	G1P[8]
25	HC 70	3 f	+	+	+	+	-	-	G1P[8]
26	HL 72	1 f	+	+	+	+	-	-	G1P[8]
27	HL 73	1 m	+	+	+	+	+(2)	-	G1P[8]
28	HL 80	11 m	+	+	+	+	-	-	G9
29	HL 81	7 m	+	+	+	+	+(3)	-	G9P[8]
30	HC 83	11 m	+	+	+	+	-	-	-
31	HC 84	8 f	+	+	+	+	-	-	G1P[8]
32	HC 87	10 m	+	+	+	+	-	-	Insufic.
33	HC 91	0,11 m	+	+	+	+	-	-	G12P[9]
34	HC 92	1 m	-(+)	+	+	+	-	-	G1P[8]
35	HC 94	4 m	+	+	+	+	-	-	G1
36	HL 95	42 f	+	+	+	+	-	-	G1P[8]
37	HC 96	43 f	+	+	+	+	-	-	G1P[8]
38	HC 107	3 f	+	+	+	+	-	-	G1P[8]
39	HL 108	2 m	+	+	+	+	-	-	G1P[8]
40	HC 111	2 m	-	+	+	+	+(1)	-	G1P[8]
41	HC 113	1 f	+	+	+	+	-	-	G1P[8]
42	HC 115	1 m	+	+	+	+	+(1)	-	G1P[8]
43	HC 116	0,8 f	-	+	+	+	+(2)	-	G1P[8]
44	HC 120	1 f	+	+	+	Insufic.	-	-	Insufic.
45	HC 122	4 f	+	+	+	+	+(1)	-	G1
46	HC 126	8 f	+	+	+	-	+(1)	-	-
47	HC 127	27 f	+	+	+	+	-	-	G1P[8]
48	HC 128	1 m	+	+	+	+	-	-	G1P[8]
49	HC 131	1 m	+	+	+	+	-	-	G1P[8]
50	HC 132	1 m	+	+	+	+	Insufic.	Insufic.	Insufic.
51	HC 138	2 m	+	+	+	+	Insufic.	Insufic.	Insufic.
52	HL 141	62 f	+	+	+	+	-	-	G1P[8]
Número	Id.	Idade	AL	ICG	EGPA	ME	LLC-	MA-104	RT-PCR

		sexo					MK ₂		
53	HC 145	1 m	+	+	+	+	-	-	G1P[8]
54	HC 147	1 f	+	+	+	+	-	-	G1P[8]
55	HC 152	1 f	+	+	+	+	-	-	G1P[8]
56	HC 155	8 f	+	+	+	+	-	-	G1P[8]
57	HC 168	3 m	+	+	+	+	-	-	-
58	HC 175	3 f	+	+	+	+	Insufic.	-	Insufic.
59	HC 181	3 m	-(+)	+	+	+	-	-	G1P[8]
60	HC 190	1 m	+	+	+	+	-	-	G1P[8]
61	HC 198	1 f	+	+	+	+	-	-	G1P[8]
62	HC 205	0,4 m	+	+	+	+	-	-	G1P[8]
63	HC 208	1 m	+	+	+	+	-	-	G1P[8]
64	HC 214	2 m	+	+	+	+	-	-	G1P[8]
65	HC 217	4 m	+	+	+	+	-	-	G1P[8]
66	HL 220	0,5 m	+	+	+	+	-	-	G1P[8]
67	HC 233	2 m	+	+	+	+	-	-	G1P[8]
68	HC 235	1 f	+	+	+	+	-	-	Insufic.
69	HC 242	1 m	+	+	+	+	-	-	G1P[8]
70	HC 246	1 f	+	+	+	+	-	-	G1P[8]
71	HC 210	1 f	+	+	+	+	-	-	G1P[8]

Legendas:

- **Id.:** Identificação da amostra.
- **Idade e Sexo:** 1 f = 1 ano feminino; 0,5 m = 5 meses masculino.
- **AL (aglutinação com látex), ICG (imunocromatografia), EGPA (eletroforese em gel de poliacrilamida):** + = positivo; - = negativo; -(+) amostra inicialmente negativa, mas, positiva em repetições.
- **ME (microscopia eletrônica):** + = positivo; - = negativo.
- **LLC-MK₂ e MA-104:** + = ECP (efeito citopático); - = ausência de ECP; (1) ECP na primeira passagem, (2) ECP na segunda passagem, (3) ECP na terceira passagem.
- **RT-PCR (reação em cadeia de polimerase associada a transcrição reversa):** A letra G seguida do número corresponde ao genótipo específico para VP7. A letra P seguida do número corresponde ao genótipo específico para VP4.
- **Insufic.:** amostra insuficiente para a realização do teste.

REFERÊNCIAS

ADAMS, W. R.; KRAFT, L. M. Epizootic Diarrhea on Infant Mice: Identification of the Etiologic Agent. **Science**. v.141, p.359-360, 1963.

ALMEIDA, J. D. et al. The effect of trypsin on the growth of rotavirus. **Journal of General Virology**. v.40, p.213-218, 1978.

ARIAS, C. F. et al. Molecular Biology of Rotavirus Cell Entry. **Archives of Medical Research**. v.33, p.356-361, 2002.

BEISNER, B.; KOOL, D.; MARICH, A.; HOLMES, I. H. Characterization of G serotype dependent non-antibody inhibitors of rotavirus in normal mouse serum. **Archives of Virology**. v.143, p.1277-1294, 1998.

BERECIARTU, A.; BOK, K.; GÓMEZ, J. Identification of viral agents causing gastroenteritis among children in Buenos Aires, Argentina. **Journal of Clinical Virology**. v.25, p.197-203, 2002.

BERN, C. et al. Rotavirus diarrhea in Bangladesh children: correlation of disease severity with serotypes. **Journal of Clinical Microbiology**. v.30, p.3234-3238, 1992.

BISHOP, R.F. et al. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non bacterial gastroenteritis. **Lancet**. v.2, p.1281-1283, 1973.

BRANDT, C. D.; KIM, H. W.; YOLKEN, R. H. Comparative epidemiology of two rotavirus serotypes and other viral agents associated with pediatric gastroenteritis. **American Journal of Epidemiology**. v.110, p.243-254, 1979.

BRIDGER, J. C.; PEDLEY, S.; McCRAE, M. Group C rotaviruses in humans. **Journal of Clinical Microbiology**. v.23, p.760-763, 1986.

BROWN, D. W. G. et al. School outbreak of gastroenteritis due to atypical rotavirus. **Lancet**. 2: 737-738, 1989.

BURKE, B.; DESSELBERGER, U. Rotavirus Pathogenicity. **Virology**. v.218, p.299-305, 1996.

CAUL, E. O. et al. Group C rotavirus associated with fatal enteritis in a family outbreak. **Journal of Medical Virology**. v.30, p.201-205, 1990.

CHEN, Z. et al. Human group C rotavirus: completion of the genome sequence and gene coding assignments of a non-cultivable rotavirus. **Virus Research**. v.83, p.179-187, 2002.

CIARLET, M.; CRAWFORD, S. E.; ESTES, M. K. Differential infection of polarized epithelial cell lines by sialic acid-dependent and sialic acid-independent rotavirus strains. **Journal of Virology**. v.75, p.11834-11850, 2001.

COSTE, A. et al. Nasal immunization of mice with virus-like particles protects offspring against rotavirus diarrhea. **Journal of Virology**. 74: 8966-8971, 2000.

COULSON, B. S. Typing of Human Rotavirus VP4 by enzyme immunoassay using monoclonal antibodies. **Journal of Clinical Microbiology**. v.31, p.1-8, 1993.

CRAWFORD, S. E. et al. Characterization of virus-like particles produced by the expression of rotavirus capsid proteins in insect cells. **Journal of Virology**. v.68, p.5945-5952, 1994.

DAS, M. et al. Both surface proteins (VP4 e VP7) of an asymptomatic neonatal rotavirus strain (I321) have high levels of sequence identity with the homologous proteins of a serotype 10 bovine rotavirus. **Virology**. v.194, p.374-379, 1993.

DESSELBERG, U. Genome rearrangements of rotaviruses, **Advances in Virus Research**. v.46, p.69-95, 1996.

DOERN, G. V.; HERRMAN, J. E.; HENDERSON, P. Detection of rotavirus with a new polyclonal antibody enzyme immunoassay (Rotazyme II) and commercial latex agglutination test (Rotalex): comparison with a monoclonal antibody enzyme immunoassay. **Journal of Clinical Microbiology**. v.23, p.226-229, 1986.

EGGLESTONE, S. I.; CAUL, E. O.; VIPOND, I. B.; DARVILLE, J. M. Absence of human astrovirus RNA in sewage and environmental samples. **Journal of Applied Microbiology**. v.86, p.709-714, 1999.

ERLICH, H. A. Principles and applications of the polymerase chain reaction. **Reviews in Immunogenetics**. v.1, p.127-134, 1999.

ESTES, M. K. et al. Simian rotavirus SA11 replication in cell cultures. **Journal of Virology**. v.31, p.810-815, 1979.

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

ESTES, M. K. Rotaviruses and Their Replication. *In*: FIELDS, B. N. ; KNIPE, D. M. **Virology**, Philadelphia, Lippincott-Raven, 1625-1655, 1996.

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

FLEWETT, T.H.; BRYDEN, A.S.; DAVIES, H.; Relation between viruses from acute gastroenteritis of children and newborn calves. **Lancet**. v.2, p.61-63, 1974.

FLEWETT, T. H. Electron Microscopy in the Diagnosis of Infectious Diarrhea. **Journal American Veterinary Medical Association**. v.173, p. 538-543, 1978.

GABBAY, Y. B. et al. An outbreak of group C rotavirus gastroenteritis among children attending a day-care centre in Belém, Brazil. **Journal of Diarrhoeal Diseases Reserch**. v.17, p.69-74, 1999.

GENTSCH, J. R. et al. Similarity of the VP4 protein of human rotavirus strain 116E to that of the bovine R223 strain. **Virology**. v.194, p.424-430, 1993.

GLASS, R. I.; KILGORE, P. E.; HOLMAN, R. C. The epidemiology of rotavirus diarrhea in the United States: Surveillance and estimates of disease burden. **Journal of Infectious Diseases**. v.174, suppl. n.1, p.5-11, 1996.

GORZIGLIA, M. et al. Sequence of the fourth gene of human rotaviruses recovered from asymptomatic or symptomatic infections. **Journal of Virology**. v.64, p.414-418, 1988.

GOUVEA, V.; GLASS, R. I.; WOODS, P. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. **Journal of Clinical Microbiology**. v.28, p.276-282, 1990.

HELLARD, M. E.; SINCLAIR, M. I.; HOGG, G. G.; FAIRLEY, C. K. Prevalence of enteric pathogens among community based asymptomatic individuals. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**. v.15, p.290-293, 2000.

HERRING, A. J. et al. Rapid Diagnosis of Rotavirus Infection by Direct Detection of Viral Nucleic Acid in Silver-Stained Polyacrylamide Gels. **Journal of Clinical Microbiology**. v.16, p.473-477, 1982.

HO, M.; GLASS, R.; PINSKI, P. Rotavirus as a cause of diarrheal morbidity and mortality in the U.S. **Journal of Infectious Diseases**. v.158, p.1112-1116, 1988.

HOSHINO, Y. et al. Identification of group A rotavirus genes associated with virulence of a porcine rotavirus and host range restriction of a human rotavirus in the gnotobiotic piglet model. **Virology**. v.209, p.274-280, 1995.

HUNG, T. et al. Rotavirus-like agent in adult non-bacterial diarrhoea in China. **Lancet**. 2: 1078-1079, 1983.

ICTV, 2004. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/fs_reovi.htm> Acesso em: 28 de novembro de 2004.

ITURRIZA-GOMARA, M.; GREEN, J.; BROWN, D. W. G.; DESSELBERGER, U.; GRAY, J. J. Comparison of specific and random priming in the reverse transcription

polymerase chain reaction for genotyping group A rotaviruses. **Journal of Virological Methods**. v.78, p.93-103, 1999.

ITURRIZA-GÓMARA, M.; KANG, G.; GRAY, J. Rotavirus genotyping: keeping up with an evolving population of human rotaviruses. **Journal of Clinical Virology**. v.31, p.259-265, 2004.

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

JONES, R.W.; ROSS, J.; HOSHINO, Y. Identification of parental origin of cognate dsRNA genome segment(s) of rotavirus reassortants by constant denaturant gel electrophoresis. **Journal of Clinical Virology**. v.26, p.347-354, 2003.

KAGA, E. et al. Molecular characterization of a human group A rotavirus isolated from an adult with severe dehydrating diarrhea and its relationship to strains concurrently circulating among children. **Clinical and Diagnostic Virology**. v.2, p.259-266, 1994.

KAPIKIAN, A. Z.; CHANOCK, A. M. Rotaviruses. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M. **Virology**, Philadelphia, Lippincott-Raven, p.1657-1708, 1996.

KAPIKIAN, A. Z.; HOSHINO, Y.; CHANOCK, R. M. Rotaviruses. In: Knipe DM, Howley RM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE, editors. *Fields Virology*, 4th edition. Lippincott Williams and Wilkins Co, Philadelphia, 1787-1834, 2001.

KLEIN, D. Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. **Trends in Molecular Medicine**. v.8, n.6, p.257-260, 2002.

KOSTOUROS, E. et al. Molecular characterization of rotavirus strains from children in Toronto, Canadá. **Journal of Clinical Virology**. p.1-8, 2002.

KRISHNAN, T. et al. Emergence of adult diarrhoea rotavirus in Calcuta, India. **Lancet**. p.353-381, 1999.

LAURETTI, F.; MELO, F. L.; BENATI, F.; VOLOTÃO, E. M.; SANTOS, N.; LINHARES, R. E. C.; NOZAWA, C. Use of acridine orange staining for the detection of rotavirus RNA in polyacrylamide gels. **Journal of Virological Methods**. v.114, p.29-35, 2003.

LUDERT, J. E. et al. Genetic mapping indicates that VP4 is the rotavirus cell attachment protein in vitro and in vivo. **Journal of Virology**. v.70, p.487-493, 1996.

LUNDGREN, O.; SVENSSON, L. Pathogenesis of Rotavirus diarrhea. **Microbes and Infection**. v.13, p.1145-1156, 2001.

- MARSHALL, J.; BOTES, J.; GORRIE, G.; BOARDMAN, C.; GREGORY, J.; GRIFFITH, J.; HOGG, G.; DIMITRIADIS, A.; CATTON, M.; BISHOP, R. Rotavirus detection and characterization in outbreaks of gastroenteritis in aged-care facilities. **Journal of Clinical Virology**. p.1-10, 2003.
- MARTIN, A. L.; FOLLETT, E. A. C. An assessment of the sensitivity of three methods for the detection of rotavirus. **Journal of Virological Methods**. v.16, p. 39-44, 1987.
- MACCRAE, M. A.; FAULKNER-VALLE, G. P. Molecular biology of rotaviruses – characterization of basic growth parameters and pattern of macromolecular synthesis. **Journal of Virology**. v.39, p.490-496, 1981.
- MENDÉZ, E. et al. Entry of a rotaviruses is a multistep process. **Virology**. v.263, p.450-459, 1999.
- METCALF, T. G.; MELNICK, J. L.; ESTES, M. K. Environmental virology; detection of virus in sewage and water – a trip of over 50 years. **Annual of Review of Microbiology**. v.49, p.461-487, 1995.
- MIDTHUN, K.; KAPIKIAN, A. Z. Rotavirus vaccines: an overview. **Clinical Microbiology Reviews**. v.9, p.423-434, 1996.
- NOZAWA, C. M.; GÓES, P.; LAMPE, E. Rotavírus: agente de diarreia infantil. **Anais de Microbiologia**. v.26, p.19-36, 1981.
- OFFIT, P. A. The rotavirus vaccine. **Journal of Clinical Virology**. v.11, p.155-159, 1998.
- OISHI, I.; YAMAZAKI, K.; MINEKAWA, Y. An occurrence of diarrhoeal cases associated with group C rotavirus in adults. **Microbiology and Immunology**. v.37, p.505-509, 1993.
- O'NEILL, H. J. et al. Clinical utility of nested multiplex RT-PCR for group F adenovirus, rotavirus and Norwalk-like viruses in acute viral gastroenteritis in children and adults. **Journal of Clinical Virology**. v.25, p.335-343, 2002.
- PANDO, V.; ISA, P.; ARIAS, C.; LÓPEZ, S. Influence of calcium on the early steps of rotavirus infection. **Virology**. v.295, p.190-200, 2002.
- RAMOS, A. P. D.; STEFANELLI, C. C.; LINHARES, R. E. C.; BRITO, B. G.; SANTOS, N.; GOUVEA, V.; LIMA, R. C.; NOZAWA, C. The stability of porcine rotavirus in feces. **Veterinary Microbiology**. 71: 1-8, 2000.
- RODGER, S. M.; BISHOP, R. F.; HOLMES, I. H. Detection of a rotavirus-like agent associated with diarrhoea in an infant. **Journal of Clinical Microbiology**. n.16, p.724-726, 1982.

SANEKATA, T.; YOSHIDA, Y.; OKADA, H. Detection of Rotavírus in faeces by latex agglutinations. **Journal of Immunological Methods**. v.41, p.377-385, 1981.

SANTOS, N.; NOZAWA, C. M. Comparação dos testes de aglutinação do látex, microscopia eletrônica e eletroforese em gel de poliacrilamida do RNA viral na detecção de rotavírus em fezes diarréicas de crianças. **Revista Brasileira de Patologia Clínica**. 25(4): 117-120, 1991.

SANTOS, N.; GOUVEA, V. Improved method for purification of viral RNA from fecal specimens for rotavirus detection. **Journal of Virological Methods**. 46: 11-21, 1994.

SANTOS, N. S. O. Viroses entéricas. In: SANTOS, N. S. O.; ROMANOS, M. T. V.; WIGG, M. D. **Introdução a Virologia Humana**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2002, p.59-74.

SANTOS, N. et al. VP7 gene polymorphism of serotype G9 rotavirus strains and its impact on G genotype determination by PCR. **Virus Research**. v.93, p.127-138, 2003.

SATO, K.; INABA, Y.; FUJII, R.; MATUMOTO, M. Isolation of human Rotavírus in cell cultures. **Archives of Virology**. v.69, p.155-160, 1981.

SHAW, A. L. et al. Three-dimensional visualization of the rotavirus hemagglutinin structure. **Cell**. v.74, p.693-701, 1993.

SOARES, C. C. et al. Prevalence of enteric adenoviruses among children with diarrhea in four Brazilian cities. **Journal of Clinical Virology**. v.23, p.171-177, 2002.

_____. et al. An outbreak of group C rotavírus gastroenteritis among adults living in Valentim Gentil, São Paulo State, Brazil. **Journal of Diarrhoeal Diseases Research**. v.16, n.2, p.59-65, 1998.

SPENCER, E. G.; AVENDANO, L. F.; GARCIA, B. I. Analysis of human rotavirus mixed electropherotypes. **Infection and Immunity**. v.39, n.2, p.569-574, 1983.

STARKEY, W.; COLLINS, J.; WALLIS, T. Kinetics, tissue specificity, and pathological changes in murine rotavirus infection of mice. **Journal of General Virology**. v.67, p.217-222, 1986.

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

TIETZOVA, J.; PETROVICOVÁ, A. Isolation of Group A human rotaviruses from faecal specimens in monkey MA-104 cells. **Acta Virologica**. v.38, p.47-50, 1994.

TIMENETSKY, M. C. S. T.; LAZAROTTI, T. S.; KISIELIUS, J. Detecção de rotavírus e adenovirus na Grande São Paulo no período de 1984-1986: estudo eletroforético do genoma do rotavírus. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**. v.47, p.77-85, 1987.

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

WARD, R. L. et al. Formation and selection of intergenogroup reassortants during cell culture adaptation of rotaviruses from dually infected subjects. **Journal of Virology**. v.65, p.2699-2701, 1991.

WYATT, R. G. et al. Human rotavirus type 2: cultivation *in vitro*. **Science**. v.207, p.189-191, 1980.

WU, Y.; LI, J.; MOU, Z.; FEI, F.; NI, B.; GENG, M.; JIA, Z.; ZHOU, L.; TANG, Y. Oral immunization with rotavirus VP7 expressed in transgenic potatoes induced high titers of mucosal neutralizing IgA. **Virology**. v.313, p.337-342, 2003.

YANG, K. et al. Immune responses and protection obtained with rotavirus VP6 DNA vaccines given by intramuscular injection. **Vaccine**. v.19, p.3285-3291, 2001.

YANG, J.; LAI, J.; DOUGLAS, S. D.; METZGER, D.; ZHU, X.; HO, W. Real-time RT-PCR for quantification of hepatitis C virus RNA. **Journal of Virological Methods**. v.102, p.119-128, 2002.

ZHANG, M.; CARL, Q.; ZENG, Y.; DONG, Y.; BALL, J. M.; SAIF, L. J.; MORRIS, A. P.; ESTES, M. K. Mutations in rotavirus nonstructural glycoprotein NSP4 are associated with altered virus virulence. **Journal of Virology**. v.72, p.3666-3672, 1998.

ANEXOS

ANEXO 1 - Técnicas

- **Clarificação de amostras fecais:**

1. Colocar aproximadamente 2g da amostra fecal juntamente com 1 ml de tampão fosfato salina (PBS) pH 7,3, em tubos *ependorf*.
2. Após homogeneizar, clarificar por centrifugação a baixa rotação (até 3.000x g) durante 20 min.
3. Os sobrenadantes clarificados são removidos com pipeta Pasteur e mantidos a – 20°C, até o momento do uso.
4. As amostras com excesso de gordura, após a clarificação, são submetidas a tratamento (vol/vol) com diclodifluoreto (freon 12).

- **Extração pelo método de Fenol-Clorofórmio:**

1. Em 400 µl do clarificado fecal adicionar 40 µl de lauril sulfato de sódio (SDS) a 10% e incubar em banho-maria a 37°C, por 30 min.
2. Adicionar 400 µl de solução saturada de fenol e clorofórmio (vol/vol).
3. Agitar por 10 min à temperatura ambiente e centrifugar a 12.000x g/12 min.
4. Transferir o sobrenadante para outro tubo *ependorf*, adicionar 40 µl de cloreto de sódio a 20% e 1 ml de etanol absoluto gelado (-20°C).
5. Após homogeneização manter o preparado à temperatura de –20°C durante, no mínimo, 18 h.
6. Centrifugar a 12.000x g/20 min.

7. Decantar o sobrenadante, e secar o sedimento em estufa ou à vácuo e adicionar 40 µl de água esterilizada. Manter a -20°C até o momento do uso.

• **Extração utilizando isotiocianato de guanidina/hidróxiapatita (GITC/HA)**
(SANTOS & GOUVEA, 1994):

1. Em 400 µl do clarificado adicionar 50 µl de solução de hidróxiapatita (HA) 25% em tampão fosfato 0,001M e manter sob agitação constante por 10 min. à temperatura ambiente (Para o RNA se ligar aos cristais de HA).
2. Após este período, as suspensões serão centrifugadas a (1700x g/1 min) e os sobrenadantes desprezados.
3. Os cristais de HA/RNA sedimentados serão acrescidos de 1 ml de uma solução de fosfato de potássio (FP) 10mM, pH 6,8, suspensos por agitação em vortéx e centrifugados a 1700x g/1 min. Repetir esta etapa por duas vezes, perfazendo um total de 3 lavagens se a extração for realizada a partir de fezes. Para o caso de cultura de células basta uma lavagem.
4. Eluir o RNA dos cristais de HA através de tratamento com 200 µl solução de FP 200mM, pH 6,8, a $37^{\circ}\text{C}/10$ min. Após a incubação, centrifugar o material a 1700x g/1 min e transferir o sobrenadante para outro tubo. Repetir a operação mais uma vez, acrescentando 200 µl de FP 200mM ao sedimento, incubar a $37^{\circ}\text{C}/10$ min, centrifugar 1.700x g/1 min. e juntar os sobrenadantes perfazendo um total de 400 µl do eluato.
5. Aos eluatos são adicionados 65 µl da solução de 5% brometo de cetilmetilamônio (CTAB) (concentração final de 0,8%), 40 µl da solução de

acetato de sódio 3M e 40 µl da solução de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,5 M, pH 7,0 (concentração final de 0,05M). As misturas são incubadas 56°C/30 min. e, em seguida, centrifugadas a 2800x g/5 min. **Obs:** tomar o cuidado de dissolver totalmente o CTAB 5% em banho-maria a 56°C antes do uso. Após centrifugação caso o material precipite, reincubá-lo a 56°C/5 min e centrifugar novamente.

6. Os sobrenadantes são desprezados e o RNA precipitado com 400 µl de H₂O (56°C) e 500 µl de álcool isopropílico por 10 min em temperatura ambiente. Em seguida, a mistura será centrifugada a 2600x g/10 min. Os sobrenadantes são desprezados e será acrescido de 40 µl da solução de acetato de sódio 3M, mais 1 ml de etanol 75%, com incubação à – 20°C durante a noite.
7. Após a incubação o RNA é centrifugado a 2600x g/10 min e o sobrenadante cuidadosamente removido. Em seguida, os sedimentos são secos em estufa a 37°C por duas horas e suspensos em 40 µl de água esterilizada.

▪ **Teste do Látex e Imunocromatografia**

Foram realizados segundo protocolos fornecidos pelos fabricantes ou seus representantes no território nacional:

1. Para látex: Rotagen Látex. Produzido por BioKit – Espanha.
2. Para Imunocromatografia: Rotavírus Tira Látex. Produzido por Operon S/A.- Espanha e distribuído no Brasil por Bioeasy Diagnóstica Ltda.

▪ **Eletroforese em Gel de Poliacrilamida do Ácido Nucléico Viral (EGPA)**

A EGPA foi realizada com homogenato fecal clarificado ou após extração por fenol/clorofórmio.

1. Tratar 40 μ l do clarificado com 20 μ l de tampão dissociante. Quando da extração por fenol/clorofórmio, tratar o precipitado dessecado com 20 μ l de tampão dissociante.
2. Incubar por 30 min. em banho-maria a 60°C.
3. Preparar os géis utilizando-se concentrações de 3,5% e 7% de acrilamida, respectivamente para o gel concentrador e separador, em sistema que permita a obtenção de géis com dimensões de 7 cm de comprimento, 8 cm de largura e 0,5 cm de espessura.
4. Aplicar as amostras no gel e realizar a corrida eletroforética por 2 h. com intensidade de corrente de 25mA.
5. Lavar o gel com solução de etanol 10% e ácido acético 2% durante 30 min.
6. Tratar o gel com solução de nitrato de prata 0,011M, por 30 min.
7. Lavar o gel por três vezes com água bidestilada.
8. Revelar o gel com solução de hidróxido de sódio 4,5% e Formaldeído 2%, até o aparecimento das bandas.
9. Bloquear a revelação pela adição de uma solução de ácido acético a 5%.
10. Lavar o gel em água e reduzi-lo em etanol comercial a 70% por alguns minutos.
11. Para conservação do gel, emblocá-lo entre folhas de papel celofane previamente lavados em água corrente e dessecá-los a temperatura ambiente.

▪ **Adaptação das amostras fecais em cultura de células**

1. Preparar o inóculo a partir do clarificado fecal tratando-se 500 µl deste clarificado com 10 µl de penicilina (10.000 UI/ml), 10 µl de estreptomicina (10.000 µg/ml) 10 µl de fungizona (0,50 mg/ml).
2. Submete-lo à centrifugação a 2.500 xg por 20 min.
3. Tratar o inóculo com tripsina cristalina na concentração final de 30 µg/ml durante 30 min. a 37°C.
4. Adicionar o inóculo à cultura de células na proporção de 1:10 (inóculo/meio fresco isento de soro fetal bovino acrescido de 10 µg/ml de tripsina cristalina).
5. Manter as culturas inoculadas em estufa a 37°C e analisá-las durante 7 dias para observação de efeito citopático (ECP).
6. As amostras que após 7 dias não apresentarem ECP serão submetidas à passagens cegas, até três vezes.

• **Preparação da Amostra Fecal para Exame de MED**

1. De posse do número de registro das amostras, identificar os *eppendorfs*.
2. Colocar 3 ml de tampão PBS 0,01M e pH 7,2.
3. Com um palito de madeira colocar de 1 a 2 porções de fezes ou até a solução ficar em torno de 10 a 20%.
4. Colocar 50 µl de tampão PBS sobre a lâmina com o material de vesícula e homogeneizar com a ponteira do pipetador.
5. Colocar 25 µl da suspensão homogeneizada sobre os orifícios do parafilme.
6. Colocar as grades e incubar a 4°C por 30 min (preparar duas grades por amostra).

Obs.: Proceder ao método de coloração negativa para MED.

- **Preparo de Grades Revestidas com *Formvar***

1. Em uma cuba de vidro tipo *pyrex* e bem limpa (não pode ser de plástico) colocar água destilada.
2. Com a cuba imóvel, colocar com uma pipeta Pasteur uma gota da solução de *Formvar*, deixando escorrer pela parede. O *Formvar* deve esticar sobre a água formando uma película incolor.
3. Colocar sobre a película, entre 40 e 50 grades limpas, com o lado brilhante para cima.
4. Com uma lâmina de vidro ou parafilme pescar as grades com a película para cima e colocá-las para secar ao ar livre, tomando cuidado para não cair poeira sobre as mesmas.

Quando secas, revestir as grades com uma película de carvão no carbonizador.

- **Microscopia Eletrônica Direta (MED)**

1. Recobrir um suporte de ponteiras com um pedaço de parafilme.
2. Com o fundo de um tubo de ensaio, marcar os orifícios pressionando o parafilme com o papel protetor voltado para cima.
3. Retirar o papel protetor.
4. Com um pipetador automático depositar uma gota de 40 μ l da amostra na cavidade do parafilme.
5. Com a pinça, colocar a grade com o lado do filme suporte sobre a gota, tomando cuidado para não romper a película da grade.

6. Incubar a 4°C por 30 min.
7. Com uma pinça, retirar a grade da amostra e remover o excesso em papel de filtro, sem deixar secar.
8. Lavar a grade em uma gota do corante PTK (Fosfotungstato de Potássio) a 2%, e colocá-la em outra gota do mesmo corante.
9. Esperar de 2 a 5 min e enxugar o excesso do corante em papel de filtro.
10. Deixar secar.
11. Observar no microscópio eletrônico, por 10 min ou cinco “campos”.

• **Imunomicroscopia Eletrônica Clássica (IME)**

1. Colocar em um tubo *ependorff* 200 µl da amostra.
2. Centrifugar a 11000 rpm por 30 min. a 4° C.
3. Em outro *ependorff* proceder à diluição desejada do soro em tampão PBS a 0,01 M e pH 7,2. Normalmente usa-se o soro na diluição de 1/250 para urina, neste caso proceder o seguinte esquema:

$$4 \mu\text{l}(\text{pool de soro}) + 16 \mu\text{l}(\text{PBS}) = 20 \mu\text{L} (1/5)$$

$$20 \mu\text{l}(1/5) + 80 \mu\text{l}(\text{PBS}) = 100 \mu\text{l}(1/25)$$

$$12 \mu\text{l}(1/25) + 108 \mu\text{l}(\text{amostra}) = 120 \mu\text{l}(1/250)$$

Obs.: Para amostras fecais é recomendada a diluição do soro na proporção de 1/500.

4. Incubar em temperatura ambiente por 1 hora, e depois deixar “overnight” a 4° C.
5. Centrifugar as amostras que ficaram “overnight” a 11000 rpm, por 30 min e a 4° C.

6. Retirar 60 μ l do sobrenadante da amostra centrifugada e homogeneizar o restante exaustivamente com o pipetador automático ou no *Vortex*. Repousar por 2 min.
7. Proceder à técnica de coloração negativa utilizada na MED.

- **RT-PCR – Elisa**

A técnica utilizada neste trabalho foi desenvolvida pela Dr^a Norma Sueli de Oliveira Santos. Esta técnica está em fase de registro de patente e por este motivo não pôde ser descrita.

ANEXO 2 – Soluções e Reagentes

I –SOLUÇÕES E MEIO DE CULTURA

1. Meio de cultura

1.1 Meio 199 pH 6,8 – 7,0

Meio 199 pH 6,8 – 7,0	9,9 g
Água destilada e deionizada q.s.p.	1000 ml

1.2 Mistura nutriente F10

Mistura nutriente F10 pH 6,8 – 7,0	9,8 g
Água destilada e deionizada q.s.p.	1000 ml

Acertar o pH a 6,8 com solução a 7,5% de NaHCO₃.

2. Solução de NaHCO₃ (7,5%)

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

3. Solução de tripsina-verseno (pH 7,3)

Verseno	0,025 g
Tripsina	0,25 g
Solução de Vermelho de Fenol a 0,5%	1 ml
Água destilada e deionizada q.s.p.	100 ml

4. Solução de Vermelho de Fenol (0,5%)

Vermelho de Fenol	0,5 g
Água bidestilada e deionizada	100 ml

II – SOLUÇÕES DE ANTIBIÓTICOS E FUNGIZONA

1. Penicilina potássica cristalina

Penicilina potássica cristalina	10.000.000 UI
Água bidestilada e deionizada estéril q.s.p.	500 ml

2. Sulfato de estreptomicina

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

3. Anfotericina B (fungizona)

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

III – SORO FETAL BOVINO

O soro fetal bovino estéril foi alíquotado e conservado a -20°C até o momento do uso.

IV – TAMPÃO FOSFATO SALINA (PBS), pH 7,3

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

Ajustar o pH com hidróxido de sódio 1N. Esterilizar por autoclavagem a 120°C por 15 min.

V – SOLUÇÃO TAMPÃO DE TRIS-HCL 0,01M pH 7,3 adicionado de Cloreto de Cálcio 0,0015M (10 vezes concentrado)

Tris hidroximetilaminometano	12,10 g
Cloreto de cálcio	2,20 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 .

VI – MISTURA FENOL/CLOROFÓRMIO (V/V)

Fenol bidestilado	50,0 ml
-------------------	---------

Clorofórmio	50,0 ml
-------------	---------

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

VII – TRIPSINA CRISTALINA (ESTOQUE)

Tripsina cristalina	1 mg
---------------------	------

PBS pH 7,3 q.s.p.	100 ml
-------------------	--------

Esterilizar por filtração em membrana de nitrocelulose MFS (0,22 µm) e estocar à – 20°C;

VIII – SOLUÇÕES PARA EGPA

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

Acrilamida	50 g
------------	------

N-N-Bismetilenoacrilamida	1,3 g
---------------------------	-------

Água destilada q.s.p.	100 ml
-----------------------	--------

2- Solução B (Tampão para gel separador) [4x] 3,5 M Tris/HCl; pH 8,8

Tris-hidroximetilaminometano	18,17 g
------------------------------	---------

Água destilada q.s.p	100 ml
----------------------	--------

Ajustar para pH 8,8 com HCl 12 N.

3- Solução C (Tampão para gel concentrador) [4x] 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8.

Tris-hidroximetilaminometano	6,06 g
------------------------------	--------

Água destilada q.s.p.	100 ml
-----------------------	--------

Ajustar para pH 6,8 com HCl 12 N.

4- Persulfato de Amônio (2%)

Persulfato de Amônio	200 mg
----------------------	--------

Água destilada q.s.p.	10 ml
-----------------------	-------

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

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 12 N.

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	3,0 g
-------	-------

2-mercaptoetanol	0,50 ml
------------------	---------

SDS a 10%	3,0 ml
-----------	--------

Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 (sol. C)	1,25 ml
--------------------------------	---------

Azul de bromofenol a 1%	0,10 ml
-------------------------	---------

Glicerol	1,0 ml
----------	--------

Água destilada q.s.p.	10,0 ml
-----------------------	---------

IX- SOLUÇÕES PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA

1- Tampão Fosfato Salino 0,01M (PBS)

Solução A

Cloreto de Sódio (NaCl) 17,58 g

Água destilada q.s.p. 2000 ml

Dissolver o NaCl na água e completar até o volume final de 2000 ml.

Solução B

Fosfato de Potássio Monobásico (KH₂PO₄) 1,36 g

Solução A 1000 ml

Dissolver o KH₂PO₄ na solução A até completar o volume final de 1000 ml.

Solução C

Fosfato de Sódio Dibásico (Na₂HPO₄/7H₂O) 1,42 g

Solução A 1000 ml

Dissolver o Na₂HPO₄/7H₂O na solução A até completar o volume final de 1000 ml.

Misturar as soluções B e C até obter pH 7,2.

2- Solução de *Formvar* a 2%

Polivinilfolmol (*Formvar*) (Sigma, TAAB) 0,4 g

Clorofórmio P.A. (MERCK) q.s.p. 20 ml

Dissolver o *formvar* em clorofórmio por pelo menos 24 horas antes do uso e homogeneizar. Armazenar a temperatura ambiente.

Obs.: O clorofórmio usado nesta solução deve ser o P.A. da MERCK, porque é o mais puro.

3- Corante Eletrônico Fosfotungstato de Potássio (PTK)

Ácido Fosfotúngstico 2 g

Solução de Hidróxido de Potássio 0,1N (até acertar o pH 6,4)

Água destilada fervida q.s.p. 100 ml

Dissolver o ácido fosfotúngstico em água sem completar o volume final. Acertar o pH em 6,4 com a solução de hidróxido de potássio a 0,1N. Completar o volume com a água destilada até 100 ml. Armazenar a solução a 4° C.

Obs.: A água destilada deve ser fervida para evitar turvação da solução.

X – SOLUÇÕES PARA PCR E EXTRAÇÃO DE RNA COM ISOTIOCIANATO DE GUANIDINA

1- Isotiocianato de guanidina 4 M (GITC)

Isotiocianato de guanidina 23,64 g

Água destilada 50,0 ml

Dissolver a solução a quente, agitando ocasionalmente. Manter a temperatura ambiente uma alíquota para uso e estocar o restante à – 20°C.

2 – Solução de K_2HPO_4 1M

K_2HPO_4	42,5 g
Água destilada q.s.p.	250,0 ml

3 – Solução de KH_2PO_4 1M

KH_2PO_4	34 g
Água destilada q.s.p.	250,0 ml

Misturar volumes iguais das duas soluções (2 e 3) para dar o pH 6,8 (Solução KP).

Autoclavar e estocar à 4°C.

4 – Solução 10 mM KP – Tampão de lavagem (diluir 1M KP 1:100)

1 M KP	1 ml
Água destilada	99 ml

Diluir em água estéril e estocar à 4°C.

5 – Solução 200 mM KP – Tampão de eluição (diluir 1M KP 1:5)

1 M KP	20 ml
Água destilada	80 ml

Diluir em água estéril e estocar a 4°C.

6 – Solução de Brometo de Cetilmetilamônio 5% (CTAB 5%)

CTAB	2,5 g
Água destilada q.s.p.	50 ml

Dissolver a frio e estocar a temperatura ambiente.

7 – Solução de Cloreto de Sódio 5M (NaCl 5M)

NaCl	14,6 g
Água destilada	50,0 ml

Estocar a temperatura ambiente.

8 – TBE 10X

Tris base	108 g
Ácido bórico	55 ml
EDTA 0,5M, pH 8,0	40 ml
Água destilada q.s.p.	1000 ml

Autoclavar e estocar a temperatura ambiente.

9 – EDTA 0,5M pH 8,0

EDTA	14,6 g
Água destilada	100 ml

Ajustar o pH para 8,0 antes de dissolver e estocar a 4°C.

10 – Etanol 70% (EtOH 70%)

EtOH	210 ml
Água destilada	300 ml

Estocar a 4°C.

11- Tampão de corrida da amostra 3X

Sacarose	2 g
Água destilada q.s.p.	10 ml
Azul de bromofenol	0,125%
Aliquotar e estocar a 4°C.	
Água destilada q.s.p.	100 ml

Detection and molecular characterization of rotavirus from children and adults in the city of Ponta Grossa, Brazil.

Pietruchinski, E.; Benati, J.F.; Lauretti, F.; Kisielius¹, J.J.; Ueda¹, M.; Volotão², E.M.; Soares², C.C.; Santos², N.; Hoshino³, Y.; Linhares, R.E.C. & Nozawa, C*.

Departamento de Microbiologia. CCB. UEL. Caixa Postal 6001. CEP 86051-970. Londrina, Pr. Brasil.

1- Seção de Microscopia Eletrônica. Instituto Adolfo Lutz. Caixa Postal 1783. CEP 01059-970. São Paulo, SP. Brasil.

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

3- Laboratory of Infectious Diseases, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892, USA.

* 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 433371 4617
e-mail: cnoz@uel.br

Abstract

Background: Rotavirus infection is a significant cause of morbidity and is a common cause of hospitalization worldwide. Its impact in the public health services is remarkable due to the direct and indirect high cost involved.

Objectives: (1) To determine the role of rotavirus infection among children and adults with diarrhea in the city of Ponta Grossa. For this, the following laboratorial methods were used: latex agglutination (LA), immunochromatography (ICG), polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), transmission electron microscopy (TEM), and cell culture isolation. (2) To genotype the strains for G (VP7) and P (VP4) specificity by RT-PCR.

Study design: The study was carried out with 251 fecal specimens collected from May to August 2003 from patients with acute diarrhea aged 6 months to 72 years old.

Results: Only group A rotavirus was detected in 71 fecal specimens out of 251 (28.3%). Children under 5 years of age were the most affected (21.9%, 55/251), however, individuals from 6 to 72 years, albeit in low percentage, accounted for 6.3 % (16/251) positivity. Out of sixty-one positive samples available and genotyped the most frequent G/P combination was G1P [8] (86.8%, 53/61), followed by G9P [8] (3.3%, 2/61), G12P

[9] (1.6%, 1/61). For three strains (4.9%) bearing G1 genotype the VP4 specificity could not be determined, and two remaining specimens (3.3%) were untypable. The strain HC91 bearing G12P [9] genotype was detected for the first time in Brazil.

Keywords: rotavirus, gastroenteritis, detection, genotyping

1. Introduction

Gastrointestinal diseases are one of the most frequent health problems worldwide, presenting high rates of morbidity and mortality especially in developing countries (Bresee et al., 1999). Among viral agents responsible for gastroenteritis, rotaviruses are the main cause around the world. It is estimated that every child be infected with rotavirus in the first 5 years of life and repeated infections are common, although repeated disease is not (Kapikian et al., 2001).

Rotaviruses are double-stranded RNA viruses comprising the genus Rotavirus in the family Reoviridae which includes seven groups (groups A-G) (Estes, 2001). Group A accounts for 95% of identified strains worldwide (Kapikian et al., 2001). The virion possesses 11 double-stranded RNA segments surrounded by three concentric proteins layers. The outermost layer is composed of two proteins, VP7 (which defines G serotypes/genotypes) and VP4 (which defines P serotypes/genotypes). There are 15 G serotypes, however, types G1-G4 and G9 are the most common globally. At least 23 different P-genotypes have been reported based on sequence analysis of the VP4 genes (Santos and Hoshino, 2004). To date the most common G/P combinations are G1P[8], G3P[8], G4P[8], G9P[8], G2P[4], and G9P[6] but other G and P types have been found in different areas of the world (Gentsch et al., 1996; Koshimura et al., 2000; Santos and

Hoshino, 2004). The G/P-epitopes are believed to be the neutralization epitopes. Hence, the distribution of G/P-genotypes/serotypes throughout the world has become an important aspect in our understanding of the epidemiology of the virus and impacts on future vaccine development (Santos and Hoshino, 2004).

Although rotavirus surveillance has been conducted regularly in Brazil for the last 2 decades (Timenetsky et al., 1994; Leite et al., 1996; Mascarenhas et al., 2002; Rosa e Silva et al., 2002; Santos et al., 2003; Souza et al., 2003; Carmona et al., 2004), few studies have been conducted in the Southern region of the country. The city of Ponta Grossa, State of Parana, is located in Southern Brazil. Herein, we present the results of a study conducted between May and August 2003 in the city of Ponta Grossa, among non-hospitalized and hospitalized patients suffering from acute diarrhea.

2. Materials and Methods

2.1. Specimens

Two hundred and fifty-one fecal samples from children and adults suffering from diarrhea were studied. These specimens were collected between May and August 2003 in the city of Ponta Grossa, State of Parana, Brazil. Two hundred and forty-six samples were from non-hospitalized patients and 5 from hospitalized patients due to severe diarrhea and dehydration. Out of the total samples, 179 were from children under 5 years of age and 72 from patients aged between 6 and 72 years old. Ten to twenty percent of clarified fecal homogenates were prepared in phosphate-buffered saline, pH 7.3, and submitted to viral detection.

2.2 Viral detection

2.2.1 Detection of virus and viral antigens

Transmission electron microscopy (TEM) negative staining was carried out as described elsewhere (Souza et al., 1998). Viral antigen was detected by latex agglutination (LA) (Biokit, Spain - Rotagen) and immunochromatography (ICG) (BioTécnica, Brasil - Stick Rotavirus) according to manufacturer's recommendation.

2.2.2 Detection of viral dsRNA

Rotavirus dsRNA was extracted from the fecal homogenates using phenol-chloroform and analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) (Herring et al., 1982).

Strain HC91 dsRNA was extracted after adaption, exceptionally, in primary African Green Monkey kidney cell culture (fig. 1).

2.2.3 Cell culture isolation

For virus isolation 70% confluent LLC-MK2 and MA-104 stationary cell cultures were used (Ramos et al., 2000)

2.3 Rotavirus Genotyping

2.3.1 Multiplex RT-PCR for G and P typing

The viral dsRNA was extracted using guanidine isothiocyanate and submitted to reverse transcription followed by multiplex PCR with specific primers for G1-G6, G8-G10, G11, P[4], P[6], P[8], and P[9], as previously described (Gouvea et al., 1990; Taniguchi et al., 1992; Gentsch et al., 1992; Isegawa et al., 1993; Das et al., 1994; Gouvea et al., 1994).

2.3.2 PCR-enzyme immune assay (EIA) for viral G typing

Rotavirus-positive samples that could not be typed by multiplex PCR were submitted to a PCR-EIA assay for G genotype identification using specific probes for genotypes G1, G8, G10, and G12, as described elsewhere (Santos et al., 2004).

3. Results

Out of 251 fecal specimens from individuals suffering from diarrhea, 71 (28.2%) were positive for group A rotavirus only, and all of them exhibited long electropherotype (L). The highest percentage of positivity, 21.9% (55/251), was observed in children under five years of age. Sixteen specimens collected from individuals aged 6 to 72 years accounted for 6.3% positivity (16/251).

An agreement of 87.3% (62/71) was attained when virus detection methods used were compared to each other, except for cell culture in which isolation was successfully demonstrated in 20.8% only (14/67), out of 67 fecal samples available.

Sixty-one rotavirus-positive samples were submitted to multiplex PCR for rotavirus G and P genotyping. G genotype was determined for 96.7% of the samples. G1 was the predominant strain (91.8%; 56/61) followed by G9 (3.3%; 2/61) and G12 (1.6%; 1/61). Nontypeable samples accounted for 3.3% (2/61). P genotype was determined for 56 samples (91.8%). All samples belonged to genotype P[8] except for one, bearing genotype P[9].

Both G and P genotypes were determined for 56 of 61 (91.8%) rotavirus strains. G1P [8] was the most frequent combination (86.9%) followed by G9P [8] (3.3%), G12P [9] (1.6%). For 3 specimens (4.9%) only the VP7 gene was amplified as G1, and two samples (3.3%) could not be amplified at all. Five of the positive specimens were from individuals aged 2, 7, 11, 62, and 64 years hospitalized due to severe

diarrhea/dehydration. The patients 2, 62 and 64 years of age were infected with G1 genotype. Additionally, two children, 7 and 11 years of age presented G9 genotype.

Figure 1 shows the comparison by PAGE of the RNA pattern of the G12 genotype, strain HC91, to those of strains L26 and Se585 detected in the Philippines (1987-1988), and in the USA (1998-1999), respectively.

4. Discussion

This study was undertaken with specimens collected from non-hospitalized and hospitalized patients in the city of Ponta Grossa, State of Parana, Southern Brazil. The significant importance of rotavirus-induced disease in children and its high incidence worldwide has been highlighted (Chang et al., 2003; Parashar et al., 2003; Bresee et al., 2004). Moreover, in this study we found a positivity of 17.7% (8/45) in individuals 6 to 14 years and 29.6% (8/27) in patients 15 to 72 years old. It would be interesting to study the true epidemiological importance of adult infection in a large scale, and certainly, the incidence is underestimated. The infection of adults was possibly transmitted by children cohort in a secondary contact as elsewhere proposed (Hrdy, 1987). However, adult infection could well provide a feedback for children infection, therefore, maintaining rotavirus in circulation in given population in a typical endemic setting (Anderson and Weber, 2004).

The global commonest genotype G1 accounted for 91.8% of the rotavirus strains characterized in our study, mostly combined with genotype P[8]. Genotype G9 has been recently described in Brazil, and its incidence appears to be increasing (Santos et al., 2001; Araujo et al., 2001). However, presently, such genotype was only detected in two specimens. The rare genotype G12 was detected in one specimen in association with P

[9] specificity. Initially, this strain was not typed by multiplex PCR because the primers regularly used in that assay did not include G12 type-specific primer. Nevertheless, when the specimen HC91 was submitted to a PCR-EIA based assay, which employs type-specific probes for all G genotypes ever detected among humans (Santos et al., 2004), it was identified as G12 genotype. To our knowledge, this is the first report of the serotype G12 in Brazil. Rotavirus genotype G12 was first detected in the Philippines nearly seventeen years ago (Taniguchi et al., 1990), and the prototype strain, identified as L26, possesses a P [4] specificity and a long electropherotype (L). Detection of this strain was not described until 2002 when a few isolates were reported, e.g., in the USA in 1998-1999, bearing a P[6] specificity and short electropherotype (S) (Griffin et al., 2002), and in Thailand, bearing P[9] specificity and L pattern (Pongsuwanna et al., 2002). In India, three G12 strains were detected in 2001 (Das et al., 2003), two of them possessed P[6] specificity being one L and the other S. Two G12P [9] strains were detected in Japan between 1999 and 2002 with L pattern (Shinozaki et al, 2004), and four G12 strains with unknown P specificity were detected in Korean (Cheon et al, 2004). More recently, G12P [9] strains were detected in a study conducted in Argentina between 1999 and 2003 and accounted for 6% of all genotypes (Castello et al., 2004a; Castello et al., 2004b). The G12P [9] L pattern detected in the present study was detected in a 11-month old non-hospitalized boy and presented a 100% percentage identity in the amino acid level with the G12, strain T152, isolated in Thailand (data not shown). Nonetheless, given the geographical proximity between the city of Ponta Grossa and Argentine border (approximately 340 miles), as well as the traffic of people and goodies across the border, we could speculate that the Brazilian G12 (HC91) strain was

probably imported from Argentina. Unfortunately, the sequences of the Argentine strains are not available.

The work presented here reinforces the need of monitoring the distribution of rotavirus genotype, as it describes the introduction of a new strain in Brazil where a high genotypic diversity already exists. Continuous rotavirus surveillance will demonstrate whether the G12 genotype will become an important strain in our country, as was the case of G5 and G9 genotypes. Further serological and molecular characterization of the strain HC91 is under development.

Acknowledgements

This work was supported by CAPES, CNPq, and FAPERJ, and is part of E.P. M.Sc. manuscript. The authors thank to A.C. da Silva, J. Ross, and R. Jones for their technical assistance.

References

- Anderson EJ, Weber SG. Rotavirus infection in adults. *Lancet Infect Dis* 2004;4:91-9.
- Araújo IT, Ferreira MSR, Fialho AM, Assis RM, Cruz CM, Rocha M, Leite JPG. Rotavirus Genotypes P [4] G9, P [6] G9, and P[8]G9 in Hospitalized Children with Acute Gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Microbiol* 2001;39:1999-1.
- Bresee JS, Glass RI, Ivanoff B, Gentsh J. Current status and future priorities for rotavirus vaccine development, evaluation and implementation in developing countries. *Vaccine* 1999;17:2207-22.

Bresee JS, Fang Z-Y, Wang B, Nelson EAS, Tam J, Soenarto Y, Wilopo SA, Kilgore P, Kim JS, Kanf JO, Lan WS, Gaik CL, Moe K, Chen K-T, Jiraphongsa C, Pongsuwanna Y, Man NV, Tu PV, Luan LT, Hummelman E, Gentsch JR, Glass R. First report from the Asian Rotavirus Surveillance Network. *Emerg Infect Dis* 2004;10:988-95.

Carmona RCC, Timenetsky MCST, da Silva FF, Granato CFH. Characterization of rotavirus strains from hospitalized and outpatients children with acute diarrhoea in São Paulo, Brazil. *J Med Virol* 2004;74:166-72.

Castello A, Arvay ML, Glass RI, Gentsch J. Rotavirus strain surveillance in Latin America: A review of the last nine years. *Pediatr Infect Dis J* 2004a;23:S168-72.

Castello AA, Jiang B, Glass RI, Glikmann G, Gentsch JR. Rotavirus G and P genotype prevalence in Argentina 1999-2003: detection of P[9]G12 strains. Abstract P37-4. Proc 23rd Ann Meeting ASV 2004b, Canada, p.272.

Chang H-GH, Glass RI, Smith PF, Cicirello HG, Holman RC, Morse DL. Disease burden and risk factors for hospitalizations associated with rotavirus infection among children in New York State, 1989 through 2000. *Pediatr Infect Dis J* 2003;22:808-14.

Cheon D-S, Lee K, Kim W, Lee S, Choi W, Ahn J, Jee Y, Cho H. Genetic analysis of the VP7 gene of unusual genotypes of human group A rotavirus strains circulating in Korea. Abstract P37-3. Proc 23rd Ann Meeting ASV 2004, Canada, p.272.

Das BK, Gentsch JR, Cicirello HG, Woods PA, Gupta A, Ramachandran M, Kumar R, Bhan MK, Glass RI. Characterization of rotavirus strains from newborns in New Delhi, India. *J Clin Microbiol* 1994;32:1820-2.

Das S, Varghese V, Chaudhury S, Barman P, Mahapatra S, Kojima K, Bhattacharya SK, Krishnan T, Ratho RK, Chhotray GP, Phukan AC, Kobayashi N, Naik TN. Emergence of novel human group A rotavirus G12 strains in India. *J Clin Microbiol* 2003;41:2760-2.

Estes MK. Rotaviruses and their replication. In: Knipe DM, Howley RM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE, editors. *Fields Virology*, 4th edition, Lippincott Williams and Wilkins Co, Philadelphia, 2001;1747-85.

Gentsch JR, Glass RI, Woods P, Gouvea V, Gorziglia M, Flores J, Das BK, Bhan MK. Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992;30:1365-73.

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 rotavirus strains: implications for vaccine development. *J Infect Dis* 1996; 174(Suppl 1):S30-6.

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. *J Clin Microbiol* 1990;28:276-82.

Gouvea V, Santos N, Timenetsky MC. Identification of bovine and porcine rotavirus G types by PCR. *J Clin Microbiol* 1994;32:1338-40.

Griffin DD, Nakagomi T, Hoshino Y, Nakagomi O, Kirkwood CD, Parashar UD, Glass RI, Gentsch JR. Characterization of nontypeable rotavirus strains from the United States: identification of a new rotavirus reassortant strain (P2A [6], G12) and rare P3 [9] strains related to bovine rotaviruses. *Virology* 2002;294:256-69.

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. *J Clin Microbiol* 1982;16:473-7.

Hrdy DB. Epidemiology of rotaviral infection in adults. *Rev Infect Dis* 1987;9:461-9.

Isegawa Y, Nakagomi O, Nakagomi T, Ishida S, Uesugi S, Ueda S. Determination of bovine rotavirus G and P serotypes by polymerase chain reaction. *Mol Cell Probes* 1993;7:277-84.

Kapikian AZ, Hoshino Y, Chanock RM. Rotaviruses. In: Knipe DM, Howley RM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE, editors. *Fields Virology*, 4th edition. Lippincott Williams and Wilkins Co, Philadelphia, 2001;1787-834.

Koshimura Y, Nakagomi T, Nakagomi O. The relative frequencies of G serotypes of rotavirus recovered from hospitalized children with diarrhea: a 10-year survey (1987-1996) in Japan with a review of globally collected data. *Microbiol Immunol* 2000;44:499-510.

Leite JPG, Alfieri AA, Woods PA, Glass RI, Gentsch JR. Rotavirus G and P types circulating in Brazil: characterization by RT-PCR, probe hybridization, and sequence analysis. *Arch Virol* 1996;141:2365-74.

Mascarenhas JDP, Linhares AC, Gabbay YB, Leite JPG. Detection and characterization of rotavirus G and P types from children participating in a rotavirus vaccine trial in Belém, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002;97:113-7.

Parashar UD, Hummelman EG, Bresee JS, Miller MA, Glass RI. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerg Infect Dis* 2003;9:565-72.

Pongsuwanna Y, Guntapong R, Chiwakul M, Tacharoenmuang R, Onvimala N, Wakuda M, Kobayashi N, Taniguchi K. Detection of a human rotavirus with G12 and P[9] specificity in Thailand. *J Clin Microbiol* 2002;40:1390-4.

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

Rosa e Silva ML, Carvalho IP, Gouvea V. 1998-1999 rotavirus seasons in Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil: detection of an unusual G3P [4] epidemic strain. *J Clin Microbiol* 2002;40:2837-42.

Santos N, Volotão EM, Soares CC, Albuquerque MCM, Silva FM, Carvalho TRB, Pereira CFA, Chizhikov V, Hoshino Y. Rotavirus strains bearing genotype G9 or P [9] recovered from Brazilian children with diarrhea from 1997 to 1999. *J Clin Microbiol* 2001;39:1157-60.

Santos N, Soares CC, Volotão EM, Albuquerque MCM, Hoshino Y. Surveillance of rotavirus strains in Rio de Janeiro, Brazil, from 1997 to 1999. *J Clin Microbiol* 2003; 41:3399-402.

Santos N, Honma S, Soares G, Sardi S, Nozawa C, Linhares RE, Hoshino Y. Development of a PCR-ELISA methodology for identification of rotavirus VP7 (G) genotypes. Abstract P37-2. Proc 23rd Ann Meeting ASV 2004, Canada, p.272.

Santos N, Hoshino Y. Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *Rev Med Virol* 2004;14:1-28.

Shinozaki K, Okada M, Nagashima S, Kaiho I, Taniguchi K. Characterization of human rotavirus strains with G12 and P [9] detected in Japan. *J Med Virol* 2004; 73:612-6.

Souza DFC, Kisielius JJ, Ueda M, Gabbay YB, Carmona RCC, Timenetsky MCST, Mascarenhas JDP, Takimoto S, Tanaka H. An outbreak of group C rotavirus gastroenteritis among adults living in Valentim Gentil, São Paulo State, Brazil. *J Diarrhoeal Dis Res* 1998;16:59-65.

Souza MBLD, Racz ML, Leite JPG, Soares CM, Martins RM, Munford V, Cardoso DD. Molecular and serological characterization of group A rotavirus isolates obtained from hospitalized children in Goiania, Brazil, 1998-2000. *Eur J Microbiol Infect Dis* 2003;22:441-3.

Taniguchi K, Urasawa T, Kobayashi N, Gorziglia M, Urasawa S. Nucleotide sequence of VP4 and VP7 genes of human rotaviruses with subgroup I specificity and long RNA pattern: Implication for new G serotype specificity. *J Virol* 1990;64:5640-4.

Taniguchi K, Wakasugi F, Pongsuwanna Y, Urasawa T, Ukae S, Chiba S, Urasawa S. Identification of human and bovine rotavirus serotypes by polymerase chain reaction. *Epidemiol Infect* 1992;109:303-12.

Timenetsky MCT, Santos N, Gouvea V. Survey of rotavirus G and P types associated with human gastroenteritis in São Paulo, Brazil, from 1986 to 1992. *J Clin Microbiol* 1994;32:2622-4.

Fig 1

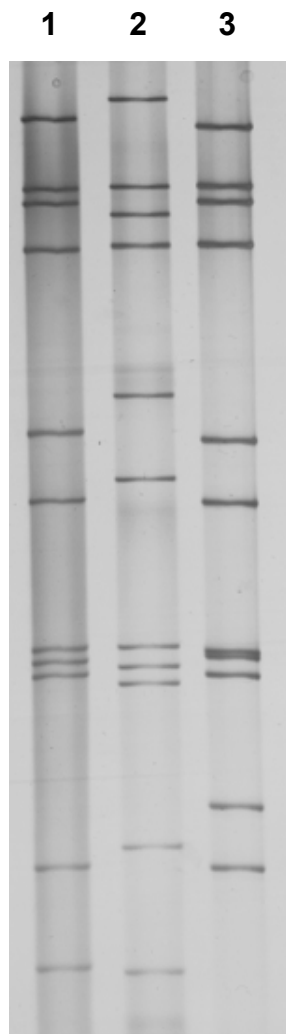


Fig. 1. Electrophoretic migration patterns of genomic RNAs of G12 rotavirus genotype. Lines 1 and 3, the prototype strains L26 and Se585, respectively; line 2, the Brazilian G12, strain HC91.b