THAIS LOURENÇO FERREIRA

PERFIL ELETROFORÉTICO DE ROTAVÍRUS EM AMOSTRAS FECAIS DIARRÉICAS E APÓS ISOLAMENTO EM CULTURA DE CÉLULAS DA LINHAGEM MA_{104}

Dissertação apresentada ao Programa de Pós–Graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia experimental e Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. José Antonio Jerez

São Paulo

2006

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1801
FMVZ

Ferreira, Thais Lourenço
Perfil eletroforético de rotavírus em amostras fecais diarréicas e após isolamento em cultura de células da linhagem $MA_{104.}$ / Thais Lourenço Ferreira. – São Paulo: T. L. Ferreira, 2006.
56 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, 2006.

Programa de Pós-graduação: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.
Área de concentração: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. José Antonio Jerez.

1. Rotavírus. 2. RNA. 3. Cultivo celular. 4. PAGE. 5. Perfil eletroferótipo. I. Título.

ERRATA

Página	Parágrafo	Linha	Onde se lê	Leia-se
Ficha catalográfica	Palavra - chave	Palavra - chave número 5	Perfil eletroferótipo	Perfil eletroforético

Página	Parágrafo	Linha	Onde se lê	Leia-se
7	1	3	electropherotyes	electropherotypes

Página	Parágrafo	Linha	Onde se lê	Leia-se
7	2	5	comprar	comparar

Página	Parágrafo	Linha	Onde se lê	Leia-se
7	2	13	serem	ser

Página	Parágrafo	Linha	Onde se lê	Leia-se
7	3	2	eletroferótipo	eletroforético

Página	Parágrafo	Linha	Onde se lê	Leia-se
8	1	1	electropherotyes	electropherotypes

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Perfil eletroforético de rotavírus em amostras fecais diarréicas e após isolamento em cultura de células da linhagem MA_{104}", protocolo nº522/2004, não utilizando animais, sob a responsabilidade do Prof. Dr. José Antonio Jerez, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendun".

(We certify that the Research "Rotaviruses electropherotypes in diarrhoeal faeces and after isolation in MA_{104} cell culture", protocol number 522/2004, not utilizing animals, under the responsibility of Prof. Dr. José Antonio Jerez, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendun", meeting.

São Paulo, 09 de setembro de 2004

Profª Drª Júlia Maria Matera
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87 - 05508-900 - Cid. Univ. "Armando de Salles Oliveira"
Fone /Fax: (011) 3032-2224/3091-7671/3091-7676

Nome: FERREIRA, Thais Lourenço

Título: Perfil eletroforético de rotavírus em amostras fecais diarréicas e após isolamento em cultura de células da linhagem MA_{104}.

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Epidemiologia experimental e Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

Data:____/____/____

Banca Examinadora

Prof.Dr._____ Instituição:_____

Assinatura:_____ Julgamento:_____

Prof.Dr._____ Instituição:_____

Assinatura:_____ Julgamento:_____

Prof.Dr._____ Instituição:_____

Assinatura:_____ Julgamento:_____

DEDICATORIAS

A Maria Luisa, minha filhota querida. Obrigada por fazer parte deste sonho. E obrigada por tornar minha vida mais feliz.

A meus pais Sônia e Aloisio, e minha irmã Renata, por me apoiarem sempre. Por todo amor, compreensão e também pela estrutura que me ofereceram para que eu pudesse seguir a diante.

Todo amor que houver nesta vida para vocês!

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Silvio Arruda Vasconcelos, por coordenar o curso de pós-graduação com extrema dedicação e empenho.

Ao meu orientador, José Antonio Jerez, pelos ensinamentos transmitidos.

A Alexandre Sanches pela ajuda e amizade.

A Daniella Ribeiro, minha ‘’irmazinha’’, por toda ajuda, incentivo e amizade. Obrigada por tudo.

Aos funcionários do VPS.

A equipe da Biblioteca da FMVZ-USP.

A Laura Villareal, pelo incentivo e amizade.

.

Aos meus colegas do curso , pelos momentos compartilhados juntos.

Aos professores do curso de pos graduação.

O Presente trabalho foi realizado com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico CNPq – Brasil.

RESUMO

FERREIRA, T. L. **Perfil eletroforético de rotavírus em amostras fecais diarréicas e após isolamento em cultura de células da linhagem MA_{104}.** [Rotaviruses electropherotyes in diarrhoeal faeces and after isolation in MA_{104} cell cultures]. 2006. 56 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

No presente estudo foi analisado o perfil eletroforético de 15 amostras de rotavírus, sendo 11 de bezerros, 02 de leitões e 02 de criança, que foram cultivadas até a sexta passagem em células da linhagem $MA_{104,}$ com o monitoramento realizado pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE). O objetivo foi comparar o perfil eletroforético de amostras fecais e após o isolamento As amostras leitões não revelaram mudanças de migração aparente, mas uma amostra apresentou um segmento adicional entre os segmentos 5 e 6, tanto no material anterior ao cultivo, quanto na amostra isolada. Em relação as amostras de crianças, uma apresentou diferença na velocidade de migração eletroforética. Além disso, uma amostra de bezerro apresentou um segmento adicional entre os segmentos 5 e 6. Estes dados ressaltam a importância da PAGE como uma técnica de triagem de amostras, que podem, posteriormente serem analisadas por técnicas moleculares mais especificas. As mudanças de comportamento na migração eletroforética dos segmentos genômicos do RNA viral podem ser sugestivas de alteração nas propriedades antigênicas, além do fato de que mudanças que ocorreram *in vitro* poderão, também, ocorrer *in vivo*.

Palavras-Chave: Rotavirus. RNA. Cultivo celular. PAGE. Perfil eletroferótipo.

ABSTRACT

FERREIRA, T. L. **Rotaviruses electropherotyes in diarrhoeal faeces and after isolation in MA_{104} cell cultures.** [Perfil eletroforético de rotavirus em amostras fecais diarréicas e após isolamento em cultura de células da linhagem MA_{104}]. 2006. 56 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

In the present work, we have analyzed the electrophoretic profile of 15 samples of rotavírus, 11 of calves, 02 of pigs and 02 of children, that have been cultivated on MA_{104} cell up to the sixth passage. The polyacrilamide gel electrophoresis(PAGE) was used to confirm the viral isolation. The aim of the work was to compare the electropherotic profile of fecal samples before and after isolation in MA_{104} cells. The samples from pigs did not reveal apparent changes in bands migration. However, an additional segment, betweem segments 5 and 6 was detected, in one fecal sample and after isolation. Furthermore, one child sample showed differences in the electrophoretic mobility and also an additional segment was detected between segments 5 – 6 in one sample from a calf. The results emphasize the importance of PAGE as a technique to screen samples that could be analyzed posteriorly by more specific molecular techniques. The changes in the electrophoretic profiles of genomic segments of viral RNA might be suggestive of changes in the antigenic properties, besides the fact that changes that occurred *in vitro* may also happen *in vivo*.

Key Words: Rotavirus. RNA. Cell culture. PAGE . Electropherotic profile.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% = porcento

apud= escrito por

et al. = e colaboradores

μL = microlitro

^{o}C = graus Celsius

g= aceleração da gravidade

dsRNA= ácido ribonucléico de fita dupla

nm= nanômetro

mA= miliamper

MEM = meio mínimo de Eagle

SFB = soro fetal bovino

mL= mililitro

M= molar

P= passagem

PAGE = eletroforese em gel de poliacrilamida

PBS = solução salina tamponada com fosfatos

pH= potencial de hidrogênio iônico

q.s.p.= quantidade suficiente para

SDS= duodecilsulfato de sódio

TEMED= tetrametiletilenodiamina

Tris= hidroximetil-aminometano

μg= micrograma

μm= micrometro

V= voltagem

v/v = volume/volume

VAS = solução ativadora de vírus

SUMÁRIO

1	**INTRODUÇÃO**.....	11
2	**REVISÃO DE LITERATURA**.....	13
3	**OBJETIVOS**.....	21
4	**MATERIAIS E MÉTODOS**.....	22
4.1	Amostra de vírus padrão.....	22
4.2	Linhagem celular.....	23
4.3	Cultura de células.....	23
4.4	Cultivo da amostra padrão NCDV de rotavírus bovino...	24
4.5	Preparo do material fecal.....	25
4.6	Tratamento com VAS.....	25
4.7	Inoculação das amostras em células.....	25
4.8	Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE).....	26
4.8.1	Extração do RNA viral.....	26
4.8.2	Preparo do gel de poliacrilamida.....	27
4.8.3	Corrida eletroforética.....	28
4.8.4	Coloração do gel com nitrato de prata.....	28
4.9	Co- eletroforese.....	29
5	**RESULTADOS**.....	30
6	**DISCUSSÃO**.....	40
7	**CONCLUSÕES**.....	43
	REFERENCIAS.....	44
	ANEXOS.....	51

1 INTRODUÇÃO

As infecções intestinais representam um grave problema tanto em saúde humana quanto animal. As diarréias agudas são responsáveis por 25 a 30% das mortes em crianças até 5 anos de idade em países em desenvolvimento e estão associadas a morbidade elevada e número relevante de hospitalizações de crianças e idosos nos paises desenvolvidos (LUNDGREN; SVENSSON, 2001). Em animais de produção, apesar da baixa mortalidade, causam grandes perdas econômicas em virtude da alta morbidade e custos com tratamento (KANEENE; HURD, 1990)

Dentre os diversos agentes envolvidos (incluindo parasitos, vírus e bactérias), os rotavírus são considerados a causa primária de diarréia em bezerros, cordeiros, leitões e potros (BLOOD; RADOSTISTS, 1989), além de responderem por aproximadamente 20% dos óbitos associados a diarréias em crianças em seus primeiros 5 anos de vida (LUNDGREN; LENNART, 2001). O vírus assume papel peculiar devido à variedade de espécies animais suscetíveis, à provável transmissão interespécie e ao potencial zoonótico (COOK, 2004).

As técnicas que envolvem a biologia molecular tais como a eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE), a reação em cadeia de polimerase (PCR) e o sequenciamento são utilizadas, em conjunto com o cultivo em cultura de célula, com a finalidade de estudos epidemiológicos que buscam um esclarecimento a respeito da diversidade genética dos rotavírus (MAUNULA; VON BONSDORFF, 2002; NAKAGOMI et al., 1988).

O cultivo celular dos rotavírus apresenta diversas finalidades, tais como diagnostico e avaliação da infectividade, além de ser uma etapa imprescindível como ponto de partida para a aplicação de técnicas moleculares, para aumento de sensibilidade (CUMINO et al.,1998; RAMOS et al., 2000; RANSHING; KELKAR, 2003).

A análise de eletroferótipos representa uma importante metodologia no estudo epidemiológico dos rotavírus. Diferenças no padrão de migração podem estar relacionadas a alterações na seqüência de nucleotídeos, tais como as resultantes de reagrupamentos genéticos (GAULT et al., 2001; WATANABLE et al., 2001).

Assim, a comparação do perfil de migração eletroforética dos segmentos genômicos antes e após o cultivo em cultura de células pode ajudar na obtenção de dados relevantes a serem pesquisados por outras técnicas de biologia molecular, tal como o seqüenciamento de segmentos genômicos envolvidos na codificação de proteínas ligadas às estruturas antigênicas dos rotavírus.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Os primeiros relatos da existência dos rotavírus ocorreram em 1969, através da reprodução experimental de um quadro de diarréia em bezerros onde foi possível identificar, por microscopia eletrônica, partículas virais que foram denominadas Nebraska Calf Diarrhea Vírus (NCDV). Nesta ocasião foi utilizado como inoculo um filtrado de material fecal, oriundo de bezerros com diarréia severa, livre de bactérias (MEBUS et al., 1969).

A detecção de NCDV em vários surtos de diarréia em 69 propriedades de criação localizadas nos Estados de Nebraska, Dakota do Sul, Illinois e California (WHITE et al., 1970) já fazia prever que seriam ubiquitarios.

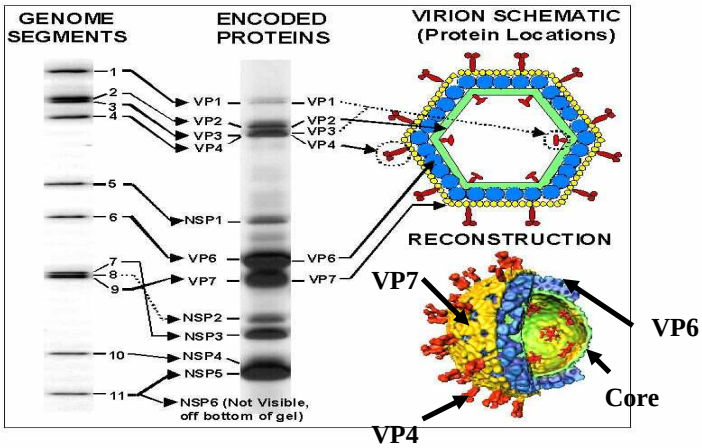
O vírus foi descrito como patógeno humano por Bishop et al. (1973). Através da microscopia eletrônica, foram detectadas partículas de 70nm de diâmetro associadas com diarréia aguda em crianças. No Brasil o vírus foi diagnosticado pela primeira vez em Belém, por microscopia eletrônica de amostras de crianças com gastrenterite (LINHARES et al.,1977).

O rotavirus é classificado como um gênero na família *Reoviridade.* Dentre as seis famílias virais existentes que possuem RNA de fita dupla (dsRNA), a *Reoviridade* é considerada a mais abrangente, com maior variedade de hospedeiros (NIBERT; SCHIFT, 2001).

O nome rotavirus deve-se ao fato das partículas apresentarem morfologia esférica, com aspecto de roda radiada (latim: *rota* = roda). A partícula viral completa mede aproximadamente 60-70nm de diâmetro. O virion não apresenta envelope, o que o torna resistente a solventes lipídeos. O capsídeo possui simetria icosaédrica, sendo constituído de três camadas concêntricas, a saber: capsídeo externo, interno e core. Esta última camada contém o genoma, constituído por um RNA de fita dupla (dsRNA) com 18522 pares de base (pb) e segmentado em 11 segmentos, que variam de 667 pb (segmento 11) a 3302 pb (segmento 1) e massa molecular entre 2 x 10^5 e 2,2

x 10^6 daltons. Estes segmentos se distribuem em quatro agregados de migração eletroforética (eletroferótipos) e são numerados de acordo com a ordem de migração na PAGE, sendo o segmento 1 o mais lento e assim sucessivamente. Nos rotavírus do grupo A (RV-A) distribuem-se em quatro agregados de migração, sendo o primeiro constituído pelos segmentos 1, 2, 3 e 4, o segundo pelos segmentos 5 e 6, o terceiro pelos segmentos 7, 8 e 9 (que parecem formar um segmento triplo) e o quarto pelos segmentos 10 e 11 (Figura 1). Estes quatro agregados de migração característica constituem o perfil de migração eletroforética ou eletroferótipo (ESTES, 2001; ESTES; COHEN, 1989; RAMING, 1994; NAKAGOMI et al., 1988).

Cada segmento é responsável pela codificação de pelo menos uma proteína específica. Desta forma, observam-se seis proteínas estruturais, denominadas VP (viral proteins), seguida por números (VP1→VP7), e seis não estruturais, denominadas NS, seguida pelo número Desta forma, os segmentos 1, 2 e 3 codificam as proteínas VP1, VP2 e VP3, respectivamente. O segmento 6 codifica a proteína VP6. Os segmentos 4 e 9 codificam VP4 e VP7. As proteínas não estruturais são codificadas pelos segmentos 5 (NSP1), 7 (NSP3), 8 (NSP2), 10 (NSP4) e 11 (NSP5 e NSP6). (ESTES, 2001; ESTES; COHEN, 1989; RAMING, 1994).



Fonte: http://www.iah.bbsrc.ac.uk/dsRNA_virus_proteins/rotavirus%20figure.htm

Figura1- Separação dos 11 segmentos de RNA por PAGE; proteínas codificadas; representação esquemática da partícula viral.

A partir do core emerge o capsídeo interno, com capsômeros em forma tubular, que confere ao virion a forma de roda radiada, no qual se encontra a proteína VP6, também conhecida por *major* por ser a maior proteína estrutural. É a proteína responsável pela especificidade de grupo, sendo os rotavírus divididos em sete sorogrupos distintos (A→G). Os sorogrupos A, B e C são encontrados tanto em humanos quanto em animais, enquanto que os sorogrupos D, E, F e G tem sido encontrados apenas em animais. O sorogrupo A (RV-A) é o de maior prevalência nas infecções por rotavirus, tanto em humanos quanto em animais. Os demais sorogrupos (B – G) eram antes chamados de pararotaviroses e atualmente são denominados RV-B, RV-C, RV-D, RV-E, RV-F e RV-G, embora ainda persista no dia a dia a denominação de rotavirus não- grupo A (KAPIKIAN et al., 2001).

O capsideo externo contém as proteínas VP4 e VP7, que são as responsáveis pela indução dos anticorpos neutralizantes sorotipo-específicos e pelo sistema binário de classificação dos sorotipos do RV- A. A VP7 é uma glicoproteína que determina a especificidade para o sorotipo G e a VP4 é uma protease sensível que determina a especificidade para sorotipo P. Até o

momento foram descritos 14 sorotipos G, denominados de G1 a G14 , sendo 10 em humanos e 13 em animais. Para a classificação do sorotipo P, atualmente utilizam-se técnicas não sorológicas, como amplificação dos segmentos genômicos pela reação em cadeia da polimerase (PCR), devido à ausência de anticorpos monoclonais para todos os sorotipos. Foi proposto um sistema binário de classificação, onde após o símbolo G coloca-se o sorotipo e, após o símbolo P é colocada a classificação em genótipo, entre colchetes. Até o momento, são conhecidos 21 genotipos P e 13 sorotipos P. (ESTES, 2001; ESTES; COHEN, 1989; KAPIKIAN et al., 2001; RAMING, 1994; TANIGUCHI et al., 1993).

O potencial zoonótico do agente tem sido o alvo de várias pesquisas. Em 1980 Mayr inseriu o agente dentro do quadro das novas zoonoses virais emergentes,ressaltando a provável transmissão interespécie

Nakagomi et al. (1990) analisou a homologia existente entre amostras humanas e animais e concluiu que a amostra RO1845, oriunda de vírus humano, apresenta grande homologia com a Ca 97, originária de felinos, e, também, com a amostra canina RS15, embora em menor grau. Otto et al. (1990) demonstrou a primeira ocorrência de RV-C em cães e ressaltou o possível papel dos animais na transmissão do rotavirus.

Shift et al. (1994) relatou evidências de que crianças poderiam ser infectadas por vírus animais ou por combinações de rotavirus humanos e animais pertencentes ao RV-A. Gabbay et al. (2003) detectaram em cães o genótipo P[3], já relatado em amostras humanas, além de evidenciarem anticorpos para rotavirus nestes animais. Nakagomi et al. (2000) concluíram que a infecção humana pela amostra HCR3 teria sido acidental, pois a amostra seria originalmente circulante em cães e gatos.

Khamrin et al. (2006) analisaram uma amostra humana atípica, (CHMH222), de classificação G3P[3] e encontraram fortes indícios de transmissão entre humanos, caprinos e símios, devido a semelhança entre as amostras CHMH222, GRV (caprinos) e RRV (simio).

Entretanto, ainda não se conhece com clareza os mecanismos envolvidos na transmissão interespécies, bem como a participação dos animais da gastroenterite infantil. Desse modo, estudos que envolvem a cadeia epidemiológica das rotaviroses revestem-se da mais significativa importância (GABBAY et al., 2003; VONSOVER et al., 1993)

Os sinais clínicos da infecção nos animais são anorexia, prostração e diarréia que pode levar a uma grave desidratação. Esses sinais não são patognomônicos, o que faz da comprovação laboratorial um importante método para um diagnostico concreto. A mortalidade depende de infecções secundárias e pode ser elevada quando se têm associações com *E. coli, Salmonela* e *Criptosporidium*, principalmente nos animais mais jovens (MEBUS, 1990).

A rotavirose bovina é caracterizada por uma curta imunidade fornecida pelo colostro, limitada aos primeiros dias após o parto Acomete, com maior freqüência, animais entre a primeira e terceira semanas de vida, ocorrendo também infecções assintomáticas (BLOOD; RADOSTISTS, 1989, BUZINARO et al., 2000). Os sorotipos G mais prevalentes são G6 e G10 e G8 (BRITO et al., 2000; SATO et al., 1997; SNODGRASS et al., 1990). Em relação ao genótipo P, já foram descritos P[1], P[5] e P[11]. (BRITO et al., 2000; GOUVÊA et al., 1994; PARWANI et al., 1993).

Em suínos, o vírus acomete animais com idade entre uma e oito semanas, sendo mais comum em animais desmamados sob condições de manejo intensivo, com três semanas de idade (BLOOD;RADOSTISTS, 1989). Os sorotipos G característicos de suínos são o G5 e o G11,enquanto que os genotipos P mais freqüentes são P[6] e P[7]. (GOUVEA, et al., 1994) As criações sofrem um grande impacto econômico com a morte de animais por desidratação e estresse, atraso no crescimento e custo indiretos com tratamento. (FU et al., 1989). A fêmea é uma importante fonte de infecção, podendo eliminar o vírus desde 5 dias antes e até duas semanas após o parto. Desta forma, o desmame precoce de leitões aumenta a suscetibilidade à infecção (BLOOD; RADOSTISTS, 1989).

A infecção em humanos apresenta graves conseqüências em todo mundo. Os rotavírus são considerados o principal agente causador de diarréia aguda infantil, resultando em desidratação. Estima-se que as rotaviroses sejam responsáveis por 125 milhões de casos de gastrenterite infantil, causando aproximadamente 800 mil mortes por ano em crianças até os cinco anos de idade (HOSHINO; KAPIKIAN, 2000; LINHARES et al*.,* 2002; OLIVEIRA; LINHARES, 1999,). Desta forma, sabe-se que durante os primeiros anos de vida quase toda criança terá um episódio de diarréia causado por rotavírus (OLIVEIRA; LINHARES, 1999). Os sorotipos mais prevalentes são G1, G2, G3 e G4. Estudos recentes demonstraram a participação de outros sorotipos em várias regiões do mundo, como por exemplo, a ocorrência de G5 no Brasil. O genótipo P mais encontrados é o P[8], seguido por P[4] e P[6] (GOUVEA; SANTOS, 1999, HOSHINO; KAPIKIAN, 2000). Adultos em geral apresentam quadros de reinfecções muito comuns, mas com manifestações clinicas mínimas ou infecções assintomáticas (KAPIKIAN, 2001). Atualmente, o desenvolvimento de vacinas abre novas perspectivas no controle dos rotavírus (MUNOZ et al., 2006).

As rotaviroses foram inicialmente diagnosticadas pela visualização direta através da microscopia eletrônica (EM), que tem a vantagem de ser altamente específica, devido à morfologia peculiar do agente. (BISHOP, 1973; KAPIIKIAN et al., 2001) Várias técnicas laboratoriais podem ser usadas no diagnóstico de rotavirus, entretanto, as mais empregadas são: ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay, PEREIRA et al., 1985), PAGE (HERRING et al., 1982) e co-aglutinação com estafilococus (DURIGON et al., 1991) A PAGE apresenta como vantagem a detecção de todos os sorogrupos e não apenas o sorogrupo A (KLINGENBERG; ESFANDIARI, 1996).

O vírus tem uma elevada resistência no meio ambiente e são eliminados em grande quantidade nas fezes (KAPIKIAN et al., 2001). Esta resistência foi avaliada por Fischer et al. (2002), quando amostras positivas para rotavirus foram deixadas de maneira não intencional em temperaturas entre 30 e 35^0 C por mais de 2 meses e mantiveram sua integridade. De

acordo com Ramos et al. (2000) os rotavírus de suíno podem manter a infecciosidade no material fecal por 32 meses a 10ºC.

A contaminação ambiental, principalmente da água, reveste-se de grande importância na epidemiologia das rotaviroses. A detecção em água de residências onde foi verificado caso de gastroenterite infantil destaca o papel da água como via de transmissão, bem como a necessidade de métodos eficazes para a detecção de vírus no meio ambiente (GRATACAP - CAVALLIER et al., 2000; KITTIGUL et al., 2001; MEHNERT et al., 1997)

A infecciosidade depende da presença do capsídeo externo. O cálcio é necessário para a estabilidade, provavelmente por ação na glicoproteina VP7, mas a concentração necessária é variável. Tratamentos com agentes quelantes de cálcio como o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e o acido etilenoglicoltetracetico (EGTA) removem o capsideo externo, resultando em perda da infecciosidade. O vírus é estável em pH entre 3 e 9. O fluorocarbono, éter, clorofórmio ou desoxicolato não alteram a integridade das partículas virais. O vírus é inativado pelo fenol, formalina, cloro e betapropiolactona. Entretanto, o etanol a 95 % é considerado o desinfetante mais eficiente (ESTES, 2001).

O isolamento de rotavirus é uma tarefa trabalhosa e dificultada pela necessidade do uso de tripsina, que atua na clivagem do VP4 em VP5* e VP 8*. As linhagens celulares MA_{104} (rim fetal de macaco Rheseus) e CaCo-2 (adenocarcinoma de cólon humano) são preferencialmente utilizadas no cultivo (CUMINO et al., 1998; KAPIKIAN et al., 2001). A utilização de tripsina em diferentes concentrações e passagens seriadas em células da linhagem MA_{104} (rim fetal de macaco Rheseus) abriu novas perspectivas para isolamento de rotavírus animais (ROSALES et al., 2004).

Como os rotavírus possuem dsRNA e segmentado, há grande probabilidade de alterações na seqüência nucleotídica. Estes rearranjos ocorrem com maior frequencia no segmento 11 (RAMING, 1994). Já foram detectadas alterações *in vitro,* após varias passagens em células da linhagem

$MA_{104,}$ onde se observou importantes mudanças no eletroferótipo, decorrentes de reagrupamentos genéticos (HUNDLEY et al., 1985)

A análise da migração dos 11 segmentos de RNA tornou-se um importante método para diferenciação das amostras de rotavírus, dada a grande variedade de migração eletroforética. A PAGE, além de ter grande importância no diagnóstico de rotavírus, representa uma técnica fundamental, tanto para a diferenciação de amostras, quanto para a identificação inicial de alterações através da visualização de mudanças nos eletroferótipos. Estas alterações podem ou não ter um significado epidemiológico relevante. Amostras de um mesmo sorotipo podem apresentar diferenças no eletroferótipo, assim como um mesmo eletroferótipo pode estar ligado a diferentes sorotipos (BUZINARO et al., 2000; KAPIKIAN et al., 2001; KOJIMA et al., 2000; PACINI et al., 1988).

Watanabe et al. (2001) demonstraram que parte desta diversidade pode ser considerada como resultado de alterações na seqüência de nucleotídeos. Em outros casos, amostras aparentemente idênticas demonstram diferenças ao serem analisadas através da co-eletroforese (NAKAGOMI et al., 2002)

A avaliação no comportamento de migração eletroforética utilizando um sistema hospedeiro tal como o cultivo celular pode permitir a formulação de hipóteses acerca de possíveis variações genéticas das amostras de rotavírus, facilitando o direcionamento de técnicas mais específicas, como o sequenciamento genomico.

3 OBJETIVOS

O Presente trabalho tem como objetivos:

- analisar o perfil eletroforético de amostras de rotavírus a partir de material fecal;
- realizar o isolamento de amostras em cultura de células da linhagem MA_{104};
- analisar possíveis alterações na migração eletroforética dos segmentos genomicos do dsRNA viral ocorridas após o isolamento.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizadas 14 amostras fecais provenientes de animais (12 bezerros e 02 leitões) com quadro clínico de diarréia, de vários surtos, de diferentes propriedades de criação localizadas em diversos municípios do Estado de São Paulo, enviadas para o diagnóstico laboratorial de rotavírus ao Laboratório de Virologia, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS), da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP), que foram positivas para rotavírus através da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE).

Foram utilizadas 04 amostras fecais de crianças com quadro clinico de gastrenterite aguda, originárias do Hospital de Assistência Médico Infantil de Urgência (AMIU), Jacarepaguá, Rio de Janeiro, onde foram reconhecidas como positivas pelo teste de aglutinação em látex, com o uso do ‘’Kit’’ Slidex Rota-kit 2 ® (Biomérieux). Posteriormente, foi realizada a PAGE no Laboratório de Viroses Veterinárias, do Instituto de Veterinária (IV) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), com a finalidade de confirmar a positividade das amostras.O material foi gentilmente cedido pela professora Maria das Graças Miranda Danelli, do Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária (DMIV), do IV, da UFRRJ.

4.1 Amostra de vírus padrão

Amostra NCDV (Nebraska calf diarrehea vírus) de rotavirus bovino, sorogrupo A, gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Takeo Sakai do College of Bioresource Science da Nihon University, adaptada ao cultivo em células da linhagem MA_{104} e mantida no laboratório de Virologia do VPS, FMVZ, USP.

4.2 Linhagem celular

Foram utilizadas células da linhagem MA_{104}, originárias de rim fetal de macaco Rhesus (ATCC número CRL-2378.1), gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Takeo Sakai do College of Bioresource Science da Nihon University, cultivadas em monocamada com meio mínimo de Eagle (MEM) com soro fetal bovino. As culturas de células foram mantidas, por meio de sucessivos repiques, no Laboratório de Virologia do VPS, FMVZ, USP.

4.3 Cultura de células

Foram preparadas de conformidade com o seguinte protocolo:

1- o meio de crescimento foi desprezado da garrafa pelo lado oposto ao da monocamada de células, em recipiente apropriado.

2- A monocamada foi lavada com PBS pH 7.2 (Anexo A).

3- Foi adicionado 3 mL de tripsina/versene (Anexo A) e aguardou-se 3 minutos.

4- A tripsina foi desprezada, deixando-se um resíduo de aproximadamente 1 mL.

5- A garrafa foi mantida em estufa a 37°C por 10 minutos, colocando a face da garrafa que contém a monocamada voltada para cima.

6-Observou-se o descolamento da monocamada, pelo manuseio da garrafa.

7-Adicionou-se meio de crescimento [MEM (Biovet®) com 10% de soro fetal bovino [(Cultilab®)] lavando a superfície interna da garrafa.

7-Homogeneizou-se as células no meio de crescimento e o conteúdo foi dividido igualmente entre as garrafas novas.

8- O volume foi completado com meio de crescimento para 10 mL.

9- As garrafas foram arrrolhadas, identificadas e levadas à estufa a 37 °C,

acompanhando-se o desenvolvimento da monocamada por meio de um microscópio óptico invertido.

4.4 Cultivo da amostra padrão NCDV de rotavírus bovino

Tendo sido produzidas as monocamadas de MA_{104}, com 48 horas de crescimento, seguiu-se a inoculação das mesmas com a amostra NCDV de rotavírus bovino, utilizada como padrão, em comparação com as amostras isoladas, observando-se o protocolo abaixo descrito:

1-Em tubo de ensaio esterilizado, foi adicionado V.A.S. (solução ativadora de vírus, contendo tripsina cristalina na proporção de 5000 μg/mL) (anexo A) à semente de vírus na proporção volumétrica de 1:3 (v/v).

2-A mistura foi incubada em banho-maria a 37 ºC por 30 minutos.

3-Desprezou-se o meio de crescimento e a monocamada foi lavada com PBS pH 7.2, transferindo 2 mL do inóculo para monocamadas de células.

4- Foi promovida a adsorção dos vírus às células por 60 minutos em estufa a 37ºC.

5- Foi adicionado meio de manutenção [MEM (Biovet®) sem soro].

6- A garrafa foi mantida em estufa a 37ºC e aguardado aparecimento de efeito citopático, observando-se as monocamadas em microscópio óptico invertido; o efeito citopático da amostra NCDV é caracterizado pelo arredondamento das células e descolamento da monocamada, normalmente em 24 horas após a inoculação.

7-Uma vez observado o efeito citopático e tendo sido completado um período mínimo de 24 horas após a inoculação, a garrafa foi congelada a -20 ºC.

4.5 Preparo do material fecal

Inicialmente, foi preparada uma suspensão fecal à 20% em tampão TRIS 0,1 M pH 7.3 (Anexo B); após homogeinização em “vortex” e centrifugação a 10000g durante 30 minutos, o sobrenadante foi recolhido e filtrado primeiramente em unidades filtrantes MILEX-MILLIPORE® de 0,45 μm de porosidade. Em seguida, realizou-se uma nova filtragem, utilizando-se unidades filtrantes de 0,22 μm de porosidade.

4.6 Tratamento com V.A.S.

A suspensão fecal filtrada foi misturada na proporção volumétrica de 3:1 (mL/mL) com V.A.S. e incubada em banho-maria a 37°C durante 30 minutos.

4.7 Inoculação das amostras em células

Foram utilizados os mesmos procedimentos descritos por Rosales et al. (2004):

Primeiramente, o meio de crescimento das monocamadas foi desprezado, a monocamada lavada com PBS 0,01 M pH 7.2. Adicionou-se 2mL da mistura de suspensão fecal filtrada e tratada com V.A.S (item 4.7); as garrafas foram levadas para estufa a 37°C durante 1 hora, para adsorção vírus-célula. Após este período, acrescentou-se meio de manutenção contendo tripsina na proporção de 5 μg/mL de meio, sem que o inóculo seja dispensado e as garrafas foram incubadas em estufa a 37°C para o

acompanhamento de efeito citopático. Uma vez observado o efeito citopático ou tendo sido completado um período de 96 horas após a inoculação, as garrafas foram congeladas a -20 ºC. Para a confirmação do efeito citopático e conseqüente certificação do isolamento, dois procedimentos foram utilizados: realização de seis passagens seriadas de cada amostra e a utilização da prova de PAGE para visualização dos segmentos do dsRNA, confirmando a presença do rotavírus.

Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram comportamento de migração eletroforética compatível com a amostra padrão NCDV.

4.8 Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE)

Foram seguidos os procedimentos preconizados por Herring et al. (1982), com algumas modificações. O material fecal foi suspenso em tampão TRIS 0,1 M pH 7.3, homogeneizado em “vortex” e centrifugado a 10000g durante 30 minutos; o sobrenadante foi então utilizado. Para as amostras de cultivo, as alíquotas foram recolhidas diretamente das garrafas, após o descongelamento das mesmas.

4.8.1 Extração do RNA viral

Foi realizado de acordo com o seguinte protocolo:

1- Em um tubo de ensaio contendo 40 μL de SDS 10% (anexo B), foi adicionado 1 mL da amostra e o mesmo foi incubado por 30 minutos em banho-maria a 37°C.

2- Decorrido esse período, adicionou-se 40 μL de fenol destilado e 40 μL de

clorofórmio; homogeneizou-se em “vortex” e aguardou-se 15 minutos, com agitação durante esse período.

3- O material foi centrifugado a 1000g durante 15 minutos.

4- O sobrenadante foi recolhido e transferido para outro tubo contendo 100 μL] de NaCl 20% e adicionou-se 1 mL de etanol absoluto; agitou-se bem.

5- O material foi incubado por uma noite (18 horas) em freezer a -20°C.

6- Centrifugou-se a 20000g durante 30 minutos.

7- O sobrenadante foi desprezado e deixou-se o tubo secar bem.

8- Adicionou-se ao precipitado 15 μL de dissociador de RNA (anexo B).

9- Incubou-se em banho-maria a 37°C durante 30 minutos.

10- O material foi adcionado ao gel de poliacrilamida.

4. 8.2 Preparo do gel de poliacrilamida

Foi realizado de acordo com o seguinte protocolo:

1-primeiramente, as placas de vidro, os espaçadores e o pente foram limpos e secos.

2-Os espaçadores foram colocados sobre uma das placas, em posição horizontal, sobrepondo a outra restante.

3-Prendeu-se com garras metálicas e, posteriormente, foi promovido o correto ajuste das peças.

4- As extremidades foram vedadas com ágar a 2%.

5-O conjunto foi colocado em posição vertical, apoiado sobre as garras, mantendo um correto nível horizontal no espaço destinado ao gel.

6-Adicionou-se o lower-gel a 7,5 % (Anexo B) até o nível ligeiramente inferior à extremidade do pente.

7-Aguardou-se a polimerização (aproximadamente 30 minutos).

8- Adicionou-se o top-gel 3,5% (Anexo B), o pente foi inserido e aguardou-se a polimerização.

4.8.3 Corrida eletroforética

1-As garras foram soltas da parte inferior do conjunto; a vedação e o espaçador da base foram retirados.
2-As placas montadas ao suporte de eletroforese vertical foram fixadas, com o auxílio das garras, evitando a formação de bolhas.
3-Os reservatórios foram preenchidos com tampão de corrida (Anexo B).
4-Eliminou-se bolhas de ar que se formaram no conjunto com o auxílio de seringa e agulha.
5-O pente foi cuidadosamente retirado, evitando-se danificar as canaletas;
6-Depositou-se 15 μl de cada amostra a ser testada nas canaletas do gel, com o auxílio de uma microseringa.
7-Conectou-se os “plugs” da fonte de eletricidade .
8- A corrente foi ajustada para 20 mA.
9-A corrida foi realizada durante aproximadamente 2 horas (após a passagem da linha de corante pelo limite inferior das placas, aguardou-se 30 minutos para que ocorresse adequada separação dos segmentos de dsRNA e o sistema foi desligado).

4.8.4 Coloração do gel com nitrato de prata

1-As placas foram retiradas do suporte.
2-Retirou-se uma das placas de vidro.
3-Eliminou-se o top-gel e foi realizado um pequeno corte na margem superior esquerda do gel para que se pudesse ter certeza da posição do gel.
4-O gel foi deslizado pela placa de vidro para um recipiente apropriado.
5- O gel foi lavado 3 vezes com água bidestilada.

6-Adicionou-se etanol-ácido acético (Anexo B), aguardou-se 30 minutos com agitações periódicas suaves em agitador do tipo “Kleine”.

7- A solução anterior foi desprezada.

8- Foi adicionado nitrato de prata 0,011 M (Anexo B). Aguardou-se 60 minutos, com agitação suave em agitador do tipo "Kleine".

9- A solução anterior foi desprezada.

10- O gel foi lavado 3 vezes com água bidestilada para que todo o resíduo de nitrato de prata fosse removido.

11-Adicionou-se a solução reveladora (Anexo B), controlando o aparecimento das bandas.

12 – A solução reveladora foi desprezada.

13 –O gel foi lavado 3 vezes com água bidestilada.

14- Foi adicionado ácido acético a 5% (Anexo B), aguardou-se 15 minutos;

15-O gel foi lavado 2 vezes com água bidestilada..

16-Adicionou-se etanol a 10%(Anexo B).

17- O gel foi examinado com auxílio de transluminador e fotografado, quando necessário.

4.9 Co-eletroforese

Para a comparação do perfil de migração eletroforética antes e após o cultivo, foi realizada a co-eletroforese. Para cada amostra, foram utilizadas três canaletas: uma contendo 15μL da amostra de material fecal anterior ao cultivo, outra com uma mistura de 10μL da amostra fecal anterior ao cultivo e 10 μL da mesma amostra adaptada em cultura de células e a terceira com 15 μL da amostra adaptada ao cultivo. Desta forma, observa-se, em paralelo e concomitantemente, o comportamento de migração eletroforética dos segmentos do dsRNA antes e após a adaptação ao cultivo celular.

Os procedimentos adotados foram os mesmos do item 4.9

5 RESULTADOS

Dentre as 18 amostras estudadas, 12 provenientes de bezerros, 02 de leitões e 04 de crianças exibiram perfil de migração eletroforética compatível com o sorogrupo a (RV-A), tal como o apresentado pela amostra padrão NCDV.

Quando submetidas ao isolamento, através do cultivo em monocamada de células da linhagem MA104, 03 amostras de bezerros e 02 de crianças acarretaram citotoxicidade; em duas amostras a citotoxicidade foi contornada pela diluição da amostra em partes iguais (V/V) de meio MEM; a outra amostra, bem como as 02 de crianças foram descartadas.

As 15 amostras foram, então, cultivadas até a sexta passagem seriada e apresentaram, em 48 horas, efeito citopático (ECP) bem característico, bastante semelhante ao da amostra padrão NCDV: arredondamento inicial das células, com posterior alongamento, perda da refringência, descolamento da monocamada, deixando-a com aspecto rendilhado. A intensidade do ECP foi diretamente proporcional ao aumento do número de passagens e o congelamento sempre foi realizado antes que se observasse a destruição total da monocamada (Figuras 2 a 5).

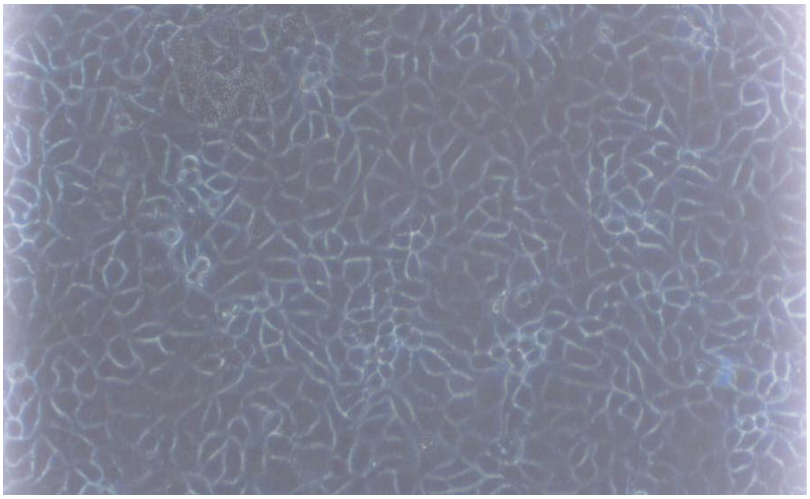


Figura 2 - Monocamada de cultura de células MA_{104} com 48 horas, pronta para inoculação, aumento de 20x

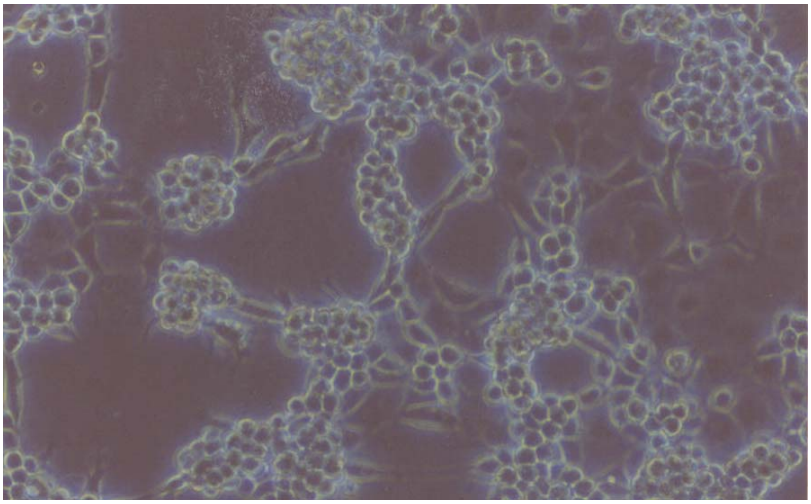


Figura 3 - Efeito citopático de rotavirus humano, 4ª passagem, com 48 horas após inoculação, aumento de 20x.

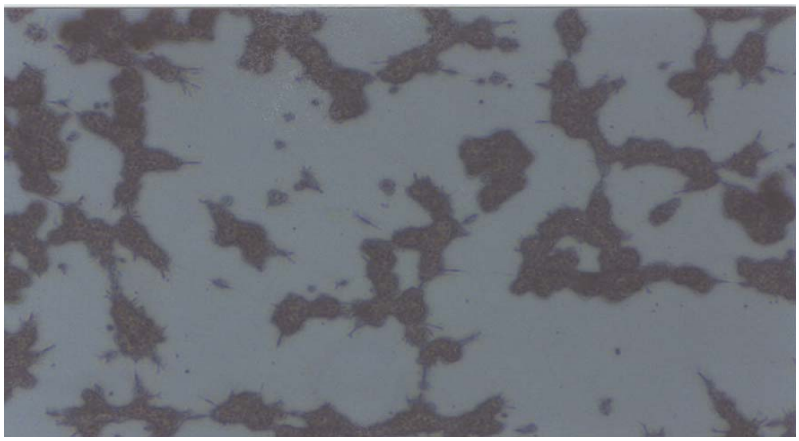


Figura 4- Efeito citopático de rotavirus bovino, 6ª passagem, com 48 horas após inoculação, aumento de 4x

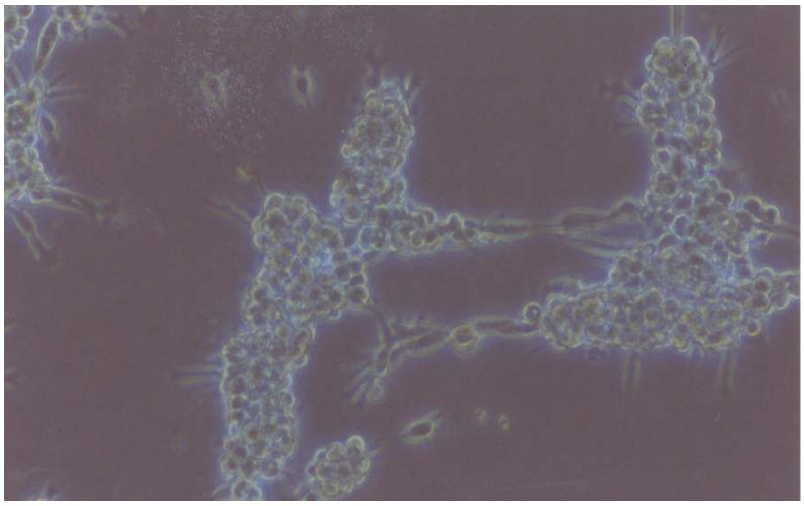


Figura 5 - Efeito citopático de rotavirus suíno, 5ª passagem, com 48 horas após inoculação, aumento de 4x.

O monitoramento das passagens, realizado pela PAGE, confirmou a presença dos rotavírus e na sexta passagem seriada foi possível a visualização de todos os segmentos de dsRNA.

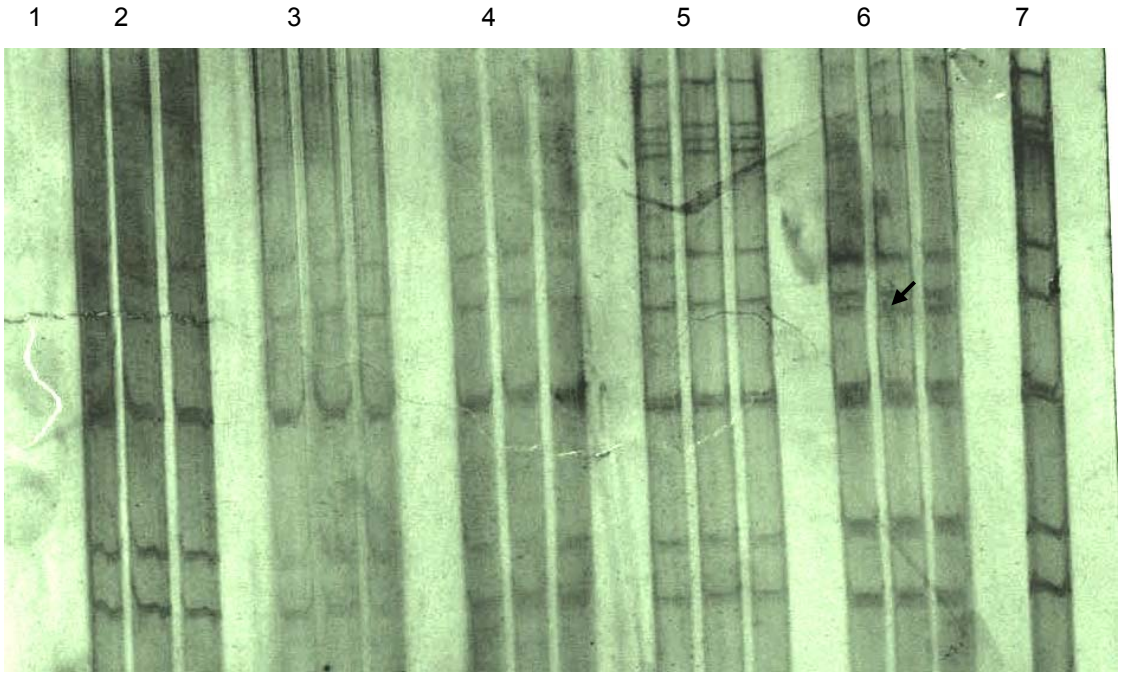
Concluída a sexta passagem seriada de todas as amostras, procedeu-se a co- eletroforese, utilizando-se a amostra fecal (anterior ao cultivo) e a amostra isolada (adaptada ao cultivo).

Em uma primeira etapa foram analisadas as amostras de origem bovina 01/04; 02/04; 03/04; 04/04 e a amostra de origem suína 05/04. Em nenhuma delas foi verificada mudança aparente no perfil de migração eletroforética dos segmentos do dsRNA. A amostra 05/04 apresentou um segmento a mais entre os segmentos 5 e 6, fato este confirmado na co-eletroforese e na amostra posterior ao cultivo (Figura 6). .

Em uma segunda etapa, as amostras 01/05; 04/05; 05/05 e 06/05 foram submetidas a PAGE e co-eletroforese. Neste caso, não foi possível identificar mudanças em relação às amostras 04/05, 05/05 e 06/05. A amostra 01/05, quando cultivada em células, parece revelar um perfil eletroforetico um pouco mais lento, quando comparado a amostra original (Figura 7).

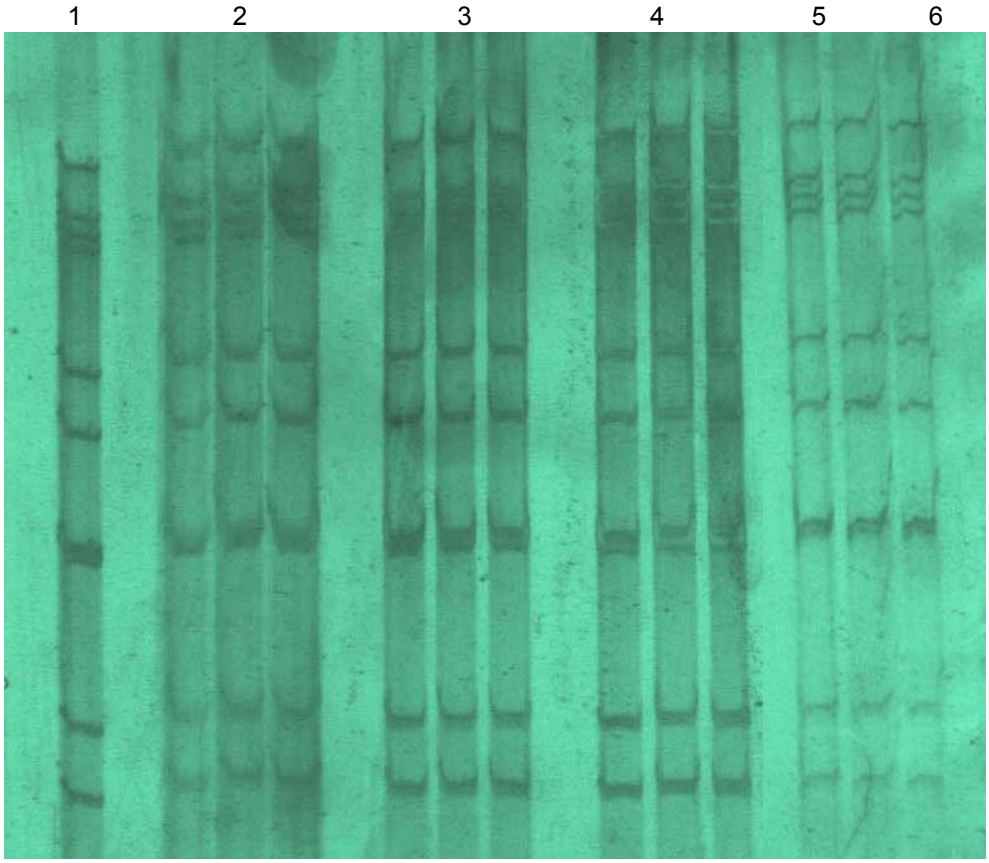
Na terceira etapa foram analisadas as amostras 12/05; 11/05; 09/05 e 07/05. Não foi possível identificar qualquer mudança no perfil de migração eletroforética em nenhuma das amostras em questão (Figura 8).

Por último, em uma quarta etapa foram analisadas as amostras 02/05 e 10/05. Além disso, as amostras 04/05, 05/05 e 11/05 foram retestadas para confirmação de resultado, mas continuaram não apresentando mudanças no perfil de migração.Entretanto a amostra 10/05 apresentou um perfil eletroforético diferente, com presença de um segmento a mais entre os segmentos 5 e 6 e (Figuras 9 e 10)



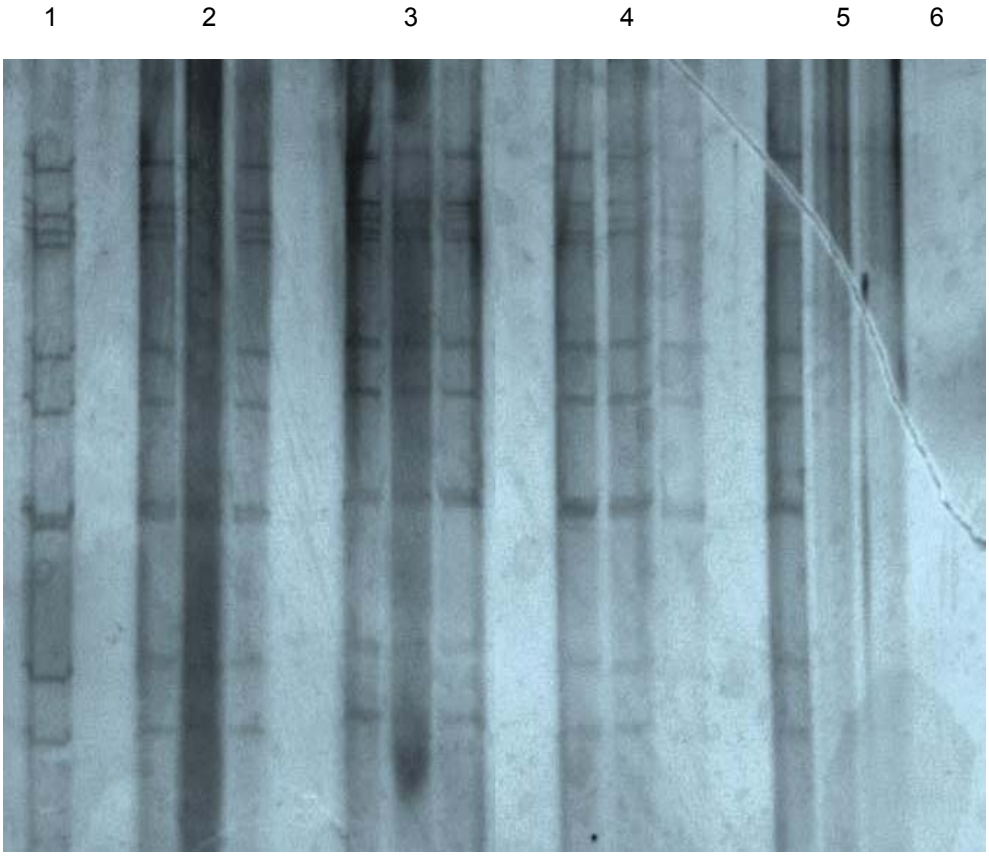
1 Controle negativo.
2 Amostra 01/04 (origem bovina) – amostra pura – co-eletroforese – amostra inoculada
3 Amostra 02/04 (origem bovina) – amostra pura – co-eletroforese – amostra inoculada
4 Amostra -03/04(origem bovina) – amostra pura – co-eletroforese – amostra inoculada
5 Amostra 04/04 (origem bovina) – amostra pura – co-eletroforese – amostra inoculada
6 Amostra 05/04(origem suína) – amostra pura – co-eletroforese – amostra inoculada
7 NCDV (controle positivo);

Figura 6 - Eletroforese em gel de poliacrilamida: co-eletroforese para comparação do perfil eletroforetico entre amostras puras e após cultivo celular (sexta passagem).



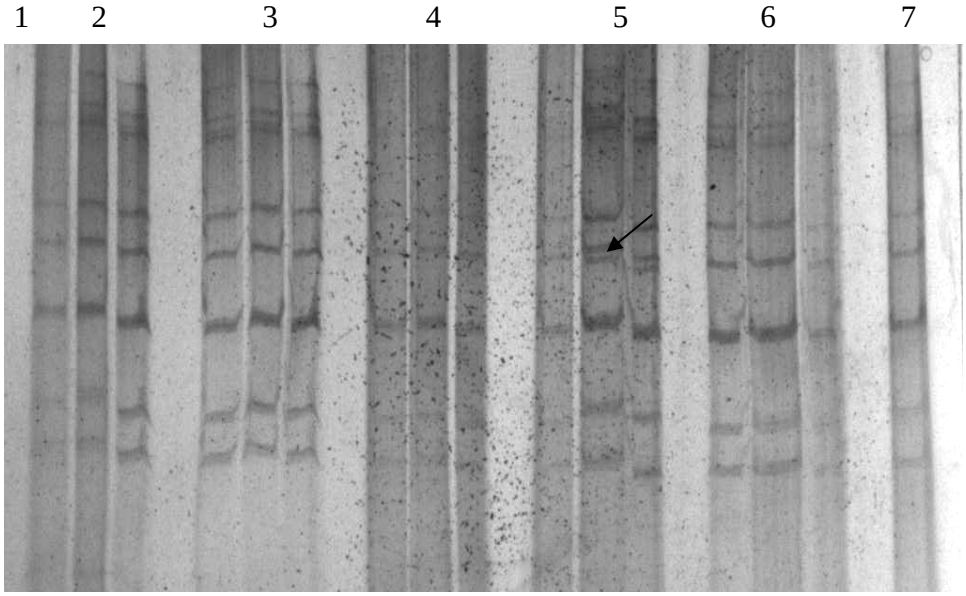
1 NCDV (controle positivo);
2 Amostra 06/05 (origem bovina) – amostra inoculada – co-eletroforese – amostra pura
3 Amostra 05/05 (origem bovina) – amostra inoculada – co-eletroforese – amostra pura
4 Amostra 04/05(origem bovina) – amostra inoculada – co-eletroforese – amostra pura
5 Amostra 01/05(origem humana) – amostra inoculada – co-eletroforese – amostra pura
6 Controle negativo

Figura 7 - Eletroforese em gel de poliacrilamida: co- eletroforese para comparação do perfil eletroforetico entre amostras puras e após cultivo celular (sexta passagem)



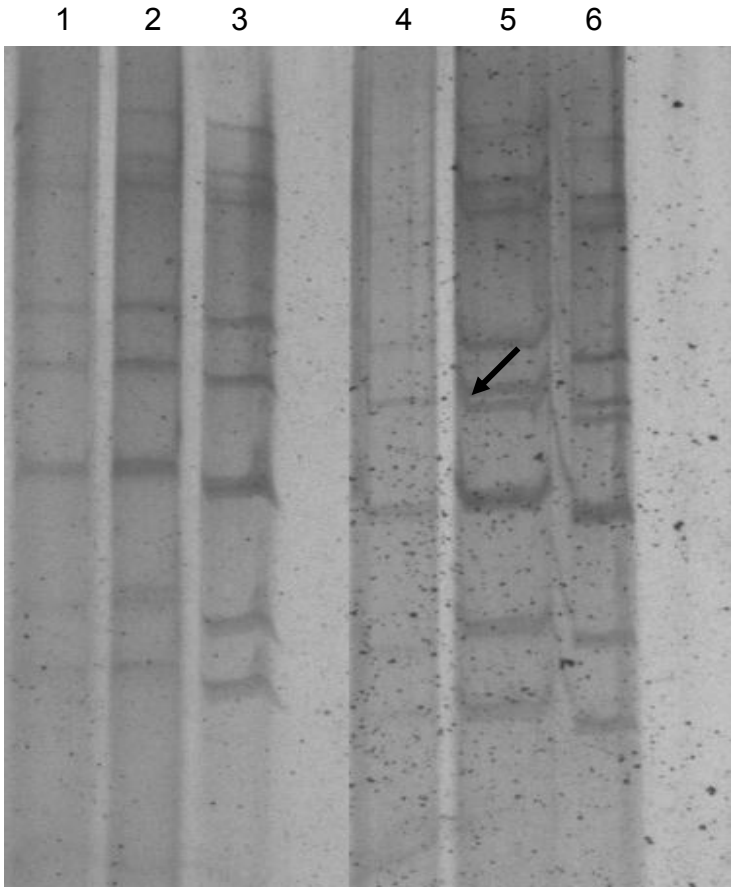
1 NCDV (controle positivo);
2 Amostra 12/05 (origem bovina) – amostra inoculada; – co-eletroforese – amostra pura
3 Amostra 11/05 (origem bovina) – amostra inoculada; – co-eletroforese – amostra pura
4 Amostra 09/05 (origem bovina)- amostra inoculada; – co-eletroforese – amostra pura
5 Amostra 07/05 (origem suína) amostra inoculada; – co-eletroforese – amostra pura
6 Controle negativo.

Figura 8 - Eletroforese em gel de poliacrilamida:co-eletroforese para comparação do perfil eletroforetico entre amostras puras e após cultivo celular (sexta passagem).



1 Controle negativo
2 Amostra 02/05 (origem bovina) – amostra pura – co-eletroforese – amostra inoculada
3 Amostra 04/05 (origem bovina) – amostra pura – co-eletroforese – amostra inoculada
4 Amostra 05/05(origem bovina) – amostra pura – co-eletroforese – amostra inoculada
5 Amostra 10/05 (origem bovina) – amostra pura – co-eletroforese – amostra inoculada
6 Amostra 11/05 (origem suína) – amostra pura – co-eletroforese – amostra inoculada
7 NCDV (controle positivo);

Figura 9 - Eletroforese em gel de poliacrilamida: co-eletroforese para comparação do perfil eletroforetico entre amostras puras e após cultivo celular (sexta passagem).



1 Amostra 02/05 (origem bovina) – amostra pura
2 Amostra 02/05 – co-eletroforese
3 Amostra 02/05 – amostra inoculada
4 Amostra 10/05 (origem bovina) – amostra pura
5Amostra 10/05 - co-eletroforese
6Amostra 10/05– amostra inoculada

Figura10 - Eletroforese em gel de poliacrilamida: co-eletroforese para comparação do perfil eletroforetico entre amostras puras e após cultivo celular (sexta passagem).

No quadro 1 encontra-se um resumo das amostras utilizadas, com os respectivos resultados.

Identificação	**Origem**	**Número de passsagens**	**Observações**	**Mudança no eletroferotipo**
01/04	Bezerro	6P	Citotoxicidade Recuperada	Sem alterações
02/04	Bezerro	6P	-	Sem alterações
03/04	Bezerro	6P	-	Sem alterações
04/04	Bezerro	6P	-	Sem alterações
05/04	Leitão	6P	Contaminação	Sem alterações – Segmento adicional
06/04	Criança	1P	Citotoxicidade Descartada	-
01/05	Criança	6P	-	Migração mais lenta
02/05	Criança	6P	-	Sem alterações
03/05	Criança	1P	Citotoxicidade Descartada	-
04/05	Bezerro	6P	Citotoxicidade Recuperada	Sem alterações
05/05	Bezerro	6P	-	Sem alterações
06/05	Bezerro	6P	-	Sem alterações
07/05	Leitão	6P	-	Sem alterações
08/05	Bezerro	1P	Citotoxicidade Descartada	-
09/05	Bezerro	6P	-	Sem alterações
10/05	Bezerro	6P	-	Segmento adicional entre os segmentos 5 e 6 Migração mais rápida
11/05	Bezerro	6P	-	Sem alterações
12/05	Bezerro	6P	-	Sem alterações

Quadro 01 - Relação de amostras totais utilizadas, passagens em células (P), com seus respectivos resultados

6 DISCUSSÃO

Os rotavirus podem infectar várias espécies animais, inclusive o homem. Dada a presença de um dsRNA e segmentado, a diversidade genômica é relevante e a possível transmissão entre diferentes espécies e o homem sugerem a ocorrência de rearranjos genômicos durante a replicação viral, contribuindo para esta diversidade (CARMONA et al., 2006; KAPIKIAN et al., 2001).

O perfil de migração eletroforética dos segmentos genômicos em PAGE foi inicialmente aplicado na diferenciação de amostras humanas e animais (KALICA; WYATT; KAPIKIAN, 1978). Posteriormente Herring et al. (1982) modificaram e simplificaram essa metodologia para aplicação ao diagnóstico laboratorial das rotaviroses, dada a probabilidade de detecção de rotavírus de diferentes sorogrupos.

Dentro dos RV-A pode haver diferença no comportamento de migração eletroforética desses segmentos genômicos (ESTES; COHEN, 1989; KAPIKIAN et al., 2001). Contudo, estas mudanças nem sempre refletem mudança na estrutura antigênica (GAULT et al., 2001).

Com o avanço da biologia molecular surgiram metodologias tais como a transcrição reversa seguida pela reação em cadeia de polimerase (RT-PCR) e o sequenciamento genômico, que forneceram informações epidemiológicas mais aprofundadas, relativas, respectivamente, a caracterização dos genotipos e a genealogia e a filogenia dos rotavírus (GOUVEIA; SANTOS; TIMENETSKY, 1994 a; 1994 b; OKADA; MATSUMOTO, 2002; RAO; GOWDA; REDY, 2000)

A PAGE, contudo, continua sendo aplicada em estudos epidemiológicos, principalmente para a comparação de amostras de surtos e distribuição sazonal (BRITO et al., 2000; BUZINARO et al., 2000)

Dada a probabilidade de segregação independente, durante, durante o processo de replicação viral dos diferentes segmentos genômicos responsáveis pela codificação das proteínas virais, o rearranjo genético poderia ser detectado pela alteração na migração eletroforética (BELLINZONI

et al., 1987; MAUNULA; VON BONSDORFF, 2002). Hundley et al. (1985) demonstraram importantes mudanças no eletroferótipo de amostras de rotavirus bovino depois de passagens seriadas em células da linhagem MA_{104} , com perda do segmento 5 e aparecimento de um segmento adicional entre os segmentos 1 e 6.

No presente estudo, analisamos inicialmente 18 amostras, sendo 12 provenientes de bezerros, 02 de leitões e 04 de crianças. Todas as amostras apresentaram padrão de migração compatível com o eletroferótipo do RV-A. Ao serem submetidas ao cultivo, através de passagens seriadas em monocamadas de células da linhagem $MA_{104,}$ duas amostras de criança e uma de bezerro foram descartadas por apresentarem citotoxicidade. As 15 amostras restantes adaptaram-se ao cultivo até a sexta passagem seriada, seguindo–se os procedimentos preconizados por Rosales et al., 2004. A confirmação do isolamento foi realizada pela PAGE, para que se tivesse certeza de se tratar realmente da replicação viral e não ação da tripsina presente na solução ativadora de vírus e no meio de manutenção.

O perfil de migração eletroforética da amostra fecal e da amostra adaptada foi comparado utilizando-se a co-eletroforese, a fim de que se pudesse ter maior clareza com relação a possíveis diferenças de migração dos diferentes segmentos genômicos.

Na primeira etapa, as amostras 01/04, 02/04, 03/04, 04/04, de origem bovina e a amostra 05/04, de origem suína (que apresentou um segmento a mais entre os segmentos 5 e 6) não apresentaram mudanças aparentes.

Em uma segunda etapa, as amostras, 04/05, 05/05 e 06/05 de origem bovina, não revelaram mudanças aparentes no eletroferotipo. Entretanto, a amostra 01/05, de origem humana, quando cultivada aparentou um perfil eletroforetico um pouco mais lento, aparentemente de todos os segmentos.

Em uma terceira etapa não foi possível detectar mudanças de eletroferotipos nas amostras 12/05; 11/05; 09/05 (origem bovina) e 07/05, de origem suína.

Por último, foram analisadas as amostras 02/05 e 10/05, de origem humana e bovina, respectivamente. As amostras 04/05, 05/05 e 11/05 foram submetidas a nova análise para confirmação de resultado. A amostra 10/05 apresentou um segmento adicional, entre os segmentos 5 e 6.

Das 15 amostras analisadas, duas apresentaram alguma mudança no perfil eletroforético. Caso um maior número de passagens fosse realizado, seria talvez possível observar, tal como observaram Hundley et al. (1985) e Kojima et al. (2000), alterações mais evidentes ou mesmo alterações em um maior número de amostras. Como até a sexta passagem seriada todas as amostras mostraram-se adaptadas ao cultivo, as alterações aqui verificadas demonstraram que a PAGE é capaz de detectar pequenas mudanças no perfil de migração eletroforética dos segmentos genômicos. A visualização dessas alterações faz com que possa ser empregada como importante técnica de triagem para que possam ser posteriormente analisadas por técnicas moleculares mais específicas, como o RT-PCR e o sequenciamento , para verificação da modificação da estrutura antigênica ou outras variabilidades geneticas dos rotavírus.

Segundo Gouvêa e Brantly (1995) os rotavírus constituem se em uma população de variantes oriundas de reagrupamentos genéticos, essenciais em sua evolução. Como conseqüência, essa população mista de rotavírus seria continuamente alterada e disseminada em diferentes hospedeiros (humanos e animais) e sujeita a seleção natural imposta pelo ambiente.

Além disso, há possibilidade de co-infecção, ou seja, infecção por mais de uma variante, tal como a amostra 10/05, que apresentou diferenças na mobilidade eletroforética (ADAH et al., 1997).

Todas essas situações podem ser inicialmente detectadas por PAGE e a partir destas alterações observadas na migração eletroforética dos diferentes segmentos genômicos, selecionam-se as amostras a serem analisadas quanto a diversidade genética e antigenicidade dos rotavírus, ou mesmo monitoramento de amostras circulantes.

.

7 CONCLUSÕES

- Foi possível realizar o isolamento de rotavírus em 15 entre 18 amostras de material fecal, até a sexta passagem seriada em cultura de células da linhagem MA_{104}.

- A análise de migração eletroforética dos segmentos genômicos da amostra fecal e após o isolamento permitiu que fossem verificadas alterações em pelo menos 2 das 15 amostras.

- A PAGE apresentou-se como uma técnica de triagem bastante adequada para selecionar amostras com probabilidade de alterações antigênicas que serão submetidas às técnicas mais complexas, tais como o Seqüenciamento genômico.

- O modelo aqui adotado revelou-se bastante útil para formulações de hipóteses com aplicações de epidemiologia molecular.

REFERÊNCIAS

ADAH, M. I.; ROHWEDDER, A.; OLALEYE, O. D.; DUROJAIYE, O. A.; WERCHAU, H. Further characterization of field strains of rotavirus from Nigeria VP4 genotype P6 most frequently identified among symptomatically infected children. **Journal of Tropical Pediatrics**, v. 43, n. 5, p. 267-274, 1997.

BELLINZONI, R. C.; MATTION, N. M.; BURRONE, O.; GONZALES, O.; LA TORRE, J. L.; SCODELLER, A. Isolation of group A swine displaying atypical eletropherotype. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 25, n. 5, p. 952-954,1987.

BISHOP, R. F.; DAVIDSON, G. P.; HOLMES, I. H.; RUCK, B. J. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gartroenterites. **The Lancet**, v. 302, n. 7841, p. 1281-1283, 1973.

BLOOD, D. C.; RADOSTITS, O. M. **Clínica Veterinária**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1989. p. 723-730.

BRITO, W. M. E. D.; MUNFORD, V.; VILLAÇA, A. M.; CARUZO, T. A. R.; RACZ, M. L. Characterization of mixed infectious with differents strains of bovine rotavirus in an outbreak of diarrhea in dairy herds in Goias, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31 n. 2, p. 140-145, 2000.

BUZINARO, M. G.; MUNFORD, V.; BRITO, V. M. E. D.; RÁCZ, M. L.; JEREZ. J. A Caracterização eletroforética e análise de subgrupos de rotavirus em rebahos bovinos leiteiros do estado de São Paulo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 52, n. 6, p. 555-561, 2000.

CARMONA, R. C.; TIMENETSKY, M. DO C.; MORILLO, S. G.; RICHTZENHAIN, L. J. Human rotavirus serotype G9, Sao Paulo, Brazil, 1996-2003. **Emerging Infectious Diseases**, v.12, n. 6, p. 963-968, 2006.

COOK, B. S.; BRIDGER, J. C.; KENDALL, K.; GOMARA, M. I.; EL- ATTAR, L.; GRAY, J. The zoonotic potencial of rotavirus, **The Journal of Infection**, v. 48, n. 4 p. 284-302, 2004.

CUMINO, A. C.; GIORDANO, M. O.; MARTÍNEZ, L. C.; MEDEOT, S. I.; PAVAN, J. V.; YUDOWSKY, S.; ISA, M. B.; DEPETRIS, A. R.; NATES, S. V. Culture amplification in human colon adenocarcinoma cell line (CaCo-2) combined with an ELISA as a supplementary assay por accurate diagnosis of rotavirus, **Journal of Virological Methods**, v. 76, p. 81-85, 1998.

DURIGON E. L.; CANDEIAS J. A.; JEREZ J. A.; BITTENCOURT M.J.; ORTOLANI E.L. Comparison of staphylococcal co-agglutination with other assays for rapid diagnosis of rotavirus infection in humans, calves and piglets, **Journal of Virological Methods**, v. 35, n. 1, p. 73-79, 1991.

ESTES, M. K. Rotaviruses and their replication In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. **Virology**. 4th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 2001, p. 1747-1785.

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

ESTES, M. K.; GRAHAM, E. M.; SMITH, E. M.; GERBA, C. P. Rotavirus stability and inactivation. **Journal of General Virology**, v. 43, n. 2, p. 403-409, 1979

FISCHER, T. K.; STEINSLAND, H.; VALENTINER-BRANTH, P. Rotavirus particles can survive storage in ambient tropical temperatures for more than 2 months. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40 n. 12, p. 4763-4764, 2002.

FU, Z. F.; HAMPSON, D. J.; BLACKMORE, D. K. Detection and survival of group A rotavirus in a piggery. **Veterinary Record,** v. 125, n. 23, p. 576-578, 1989.

GABBAY, Y. B.; HOMEM, V. S. F.; MUNFORD, V.; ALVES, A. S.; MASCARENHAS, J. D. P.; LINHARES, A. C.; RÁCZ, M. L. Detection of rotavirus in dogs with diarrhea in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology,** v. 34. p. 77-80, 2003.

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

GOUVEA, V.; BRANTLY, M. Is rotavirus a population of reassortants? **Trends in Microbiology** , v. 3 n. 4 p. 159-160, 1995.

GOUVEA, V.; SANTOS, N. Rotavirus serotype:G5: an emerging cause of epidemic childhood diarrhea. **Vaccine**, v.17, p.1291-1292, 1999

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

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

GRATACAP-CAVALLIER, B.; GENOULAZ, O.; BRENGEL-PESCE, K.; SOULE, H.; INNOCENTI-FRANCILLARD, P.; BOST, M.; GOFTI, L.; ZMIROU, D.; SEIGNEURIN, J. M. Detection of human and animal rotavirus sequences in drinking water. **Applied and environmental microbiology**, v. 66, n. 6, p. 2690-2692, 2000.

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

HOSHINO, Y.; KAPIKIAN, A. Z. Rotavirus serotypes: classification and importance in epidemiology, immunity, and vaccine development. **Journal of Health, Population and Nutrition**, v. 18, n. 1, p. 5-14, 2000.

HUNDLEY, F.; BIRYAHWAHO, B.; COW, M.; DESSELBERG, U. Genome rearrangement of bovine rotavirus after serial passage at high multiplicity of infection. **Virology**, v. 143, n. 1, p. 88-103, 1985.

KALICA, A.R.; WYATT, R.G.; KAPIKIAN, A.Z. Detection of differences among human and animal rotaviruses, using analysis of viral RNA. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v. 173, p. 531-537, 1978.

KANEENE, J. B; HURD, H. S. The national animal health monitoring system in Michigan. III – Cost estimates of selected dairy cattle diseases. **Preventive Veterinary Medicine,** v. 8, n. 1, p. 127-140, 1990.

KAPIKIAN, A. Z.; HOSHINO, Y.; CHANOCK, R. M. Rotaviruses. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P.M. **Virology**. 4th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 2001. p.1787-1822.

KHAMRIM, P.; MANEEKARN, N.; PEERAKOMES, S.; YAGYUIF, F.; OKITSU, S.; USHIJIMA, H. molecular characterization of a rare G3P[3] human rotavirus reassortant strain reveals evidences of multiple human-animal interspecies transmissions. **Journal of Medical Virology**, v. 78, n. 7, p. 986-994, 2006.

KITTIGUL, L.; KHAMOUN, P.; SUJIRARAT, D.; UTRARACHKIJ, F.; CHITPIROM, K.; CHAICHANTANAKIT, N.; VATHANOPHAS, K. An improved method for

concentrating rotavirus from water samples. . **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96 n. 6 p. 815-821, 2001.

KLINGENBERG, K. V.; ESFANDIARI, J. Evaluation of one-step for rapid, in pratice detection of rotavirus in farm animals. **Veterinary Record**, v.138, p. 393-395, 1996.

KOJIMA, K.; TANIGUCHI, K.; KAWAGISHI-KOBAYASHI M.; MATSUNO, S.; URASAWA, S. Rearrangement generated in double genes, NSP1 and NSP3, of viable progenies from a human rotavirus strain. **Virus Research**, v. 67, p. 163 – 171, 2000.

LINHARES, A. C.; PINHEIRO, F. P.; SCHMETZ , C.; MULLER, G.; PETERS, D. Duovirus (rotavirus) em Belem do Para, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 19, n. 4 p. 278-279, 1977.

LINHARES, A. C.; CARMO, K. B.; OLIVEIRA, K. K.; OLIVEIRA, C. S.; FREITAS, R. B.; BELLESI, N.; MONTEIRO, T. A. F.; GABBAY, Y. B.; MASCARENHAS, J. D. P. Nutritional status in relation to the efficacy of the rhesus-human reassortant, tetravalent rotavirus vaccine (rrv-tv) in infants from Belém, Pará state, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo,** v. 44 n. 1, p. 13-16, 2002.

LINHARES, A. C.; PINHEIRO, F. P.; SCHMETZ , C.; MULLER, G.; PETERS, D. Duovirus (rotavirus) em Belem do Para, Brasil. **Revista do .Instituto.de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 19, n. 4 p. 278-279, 1977.

LUNDGREN, O.; SVENSSON, L. Pathogenesis of rotavirus diarrhea. **Microbes and Infection**, v. 3, n. 13, p. 1145-1156, 2001.

MALHERBE, H.; HARWIN, R. The cytopathic effetcts of vervet monkey virases. **South African Medical Journal**, v. 20, n. 37, p. 407-411,1963.

MAUNULA, L.; VON BONSDORFF, C. H. Frequent reassortments may explain the genetic heterogeneity of rotaviruses: analysis of Finnish rotavirus strains. **Journal of Virology**, v. 76, n. 23, p. 11793-11800, 2002.

MAYR, A. New emerging viral zoonoses. **The Veterinary Record**, v. 106 n. 24, 1980.

MEBUS, C. A. Bovine and ovine rotavirus. In; DINTER, Z.; MOREIN, B. **Virus infectious of ruminants**. New York: Elsevier Science, 1990, p. 239-244.

MEBUS,C. A.; KONO, M.; UNDERDAHL, N. R.; TWIEHAUS, M. J.; Cell culture propagation of neonatal calf diarrhea(scours) virus. The **Canadian Veterinary Journal,** v. 12, n. 3 p. 69- 72, 1071.

MEBUS, C. A.; UNDERDAHL, N. R.; RHODES, M. B.; TWIEHAUS, M.J . Further studies on neonatal calf diarrhea virus. **Proceedings annual meetings of the United States annual Health Association**, v. 73, p. 97 – 99, 1969.

MEHNERT, D. U.; STEWIEN, K. E.; HÁRSI, C. M.; QUIROZ, A. P. S.; CANDEIAS, J. M. G.; CANDEIAS, J. A. N. Detection of rotavirus in sewage and creek water: efficiency on the concentration method. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 92 n. 1 p. 97-100, 1997.

MUNOZ, M. A.; ABARCA, V. K.; LUCHSINGER, F. V.;VALENZUELA, B. M. T.; JIMENEZ DE LA J. J. Rotavirus Vaccine. Statement of the Consultive Committee of Immunizations on behalf of The Chilean Infectious Diseases Society: March 2006. **Revista Chilena de Infectologia**, v. 23, n. 2, p. 124-127, 2006.

NAKAGOMI, O.; OHSHIMA, A.; ABOUDY, Y.; SHIFT, I.; MOCHIZUKI, M.; NAKAGOMI, T.; GOTLIED-STEMATSKY, T. Molecular identification by RNA-RNA hybridization of a human rotavirus that is closely related to rotaviruses of feline and canine origin. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28 n. 6, p. 1198-1203, 1990.

NAKAGOMI, T.; AKATANI, K.; IKEGAMI, N.; KATSUSHIMA, N.; NAKAGOMI, O. Occurrence of changes in human rotavirus serotypes with concurrent changes in genomic RNA electropherotypes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 26 n. 12, p. 2586 -2592, 1988.

NAKAGOMI, T.;GENTSCH, J. R.; DAS, B. K.; KUMAR, R.; BHAN, M. K.; GLASS, R.I.; NAKAGOMI, O. Molecular characterization of serotype G2 and G3 human rotavirus strains that have an apparently identical electropherotype of the short RNA pattern. **Archives of Virology**, v. 147, n. 11, p. 2187-2195, 2002.

NAKAGOMI, T.; NAKAGOMI, O.; Human rotavirus HCR3 possesses a genomic RNA constellation indistinguishable from that of feline and canine rotaviruses**. Archives of Virolology,** v. 145, n. 5. p. 2403-2409, 2000.

NIBERT, M. L.; SCHIFT, L. A. Reoviruses and their replication In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. **Virology**. 4th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 2001, p.1679-1680.

OKADA, N.; MATSUMOTO, Y. Bovine rotavirus G and P types and sequence analysis of the VP7 gene of two G8 bovine rotavirus from Japan. **Veterinary Microbiology**, v. 84, n. 4, p. 297-305, 2002.

OLIVEIRA, C. S.; LINHARES, A. C. Rotavirus: aspectos clínicos e prevenção.**Jornal de Pediatria**, v. 75, n. 1, p. 91-102, 1999.

OTTO, P.; SCHULZE, P.; HERBST, W. Demonstration of group C rotaviruses in fecal samples of diarrheic dogs in Germany. **Archives of Virology**, v. 144 n. 12 , p. 2467-2473, 1999.

PACINI, D. L.; BRADY, M. T.; BUDDE, C. T.; CONNELL, M. J.; HAMPARIAN, V. V.; HUGHES, J. H. Polyacrylamide gel electrophoresis of RNA compared with polyclonal- and monoclonal-antibody-based enzyme immunoassays for rotavirus. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 26, n. 2, p. 194-197, 1988.

PARWANI, A.V.; HUSSEIN, H.A.; ROSEN, B.I.; LUCCHELLI, A.; NAVARO, L.; SAIF. L.J. Characterization of field strains of group A bovine rotaviruses by using polymerase chain reaction-generated G and P Type – specific cDna probes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 8 p. 2010-2015, 1993.

PEREIRA, H. G.; AZEREDO, R. S.; LEITE J. P.; ANDRADE Z. P.; DE CASTRO L. A. Combined enzyme immunoassay for rotavirus and adenovirus (EIARA).**Journal of Virological Methods**, v. 10, n. 1, p. 21-28, 1985.

RAMING, R. F.. Rotaviruses. In: The rotavirus genome. Texas: Springer Verlag, 1994, p. 49-51.

RAMOS, A. P. D.; STEFANELLI, C. C.; LINHARES, R. E. C.; BRITO, B. G.; SANTOS, N.; GOUVEA, V.; LIMA, R. C.;NOZAWA, C. M. The stability. Of porcine rotavirus in feces. **Veterinary Microbiology**, v. 71, n. 1-2, p.1-8, 2000.

RANSHING, S. S.; KELKAR, S. D.; Isolation and characterization of dually reactive strains of group A rotavirus from hospitalizated children. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 11, p. 5267-5269, 2003.

RAO, C.D.; GOWDA, K.; REDDY, B.S. Sequence analysis of VP4 and VP7 genes of nontypeable strains identifies a new pair of outer capsid proteins representing novel P and G genotypes in bovine rotavirus. **Virology**, v. 276, n. 1, p. 104-113, 2000.

ROSALES, C. A. R.; BRANDÃO, P. E.; FERREIRA, F.; GREGORI, F.; BUZINARO, M. G.; JEREZ, J. A. Improved animal rotavirus isolation in MA_{104} cells using different trypsin concentration. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 71, n. 4, p. 437-441, 2004.

SATO, M.; NAKAGOMI, T.; TAJIMA, K.; EZURA, K.; AKASHI, H.; KAKAGOMI, O. Isolation of serotype G8, P6[1] bovine rotavirus from adult cattle with diarrhea,.**Journal of Clinical Microbiology**, v. 35,n. 5, p. 1266-1268, 1997.

SHIFT, I.; SILBERSTEIN, I.; MENDELSON, E.; Evidence that human babies may become infected by animal rotaviruses. **Israel Journal of Medical Sciences,** v. 30, p. 387-391, 1994.

SNODGRASS, D. R.; FITZGERALD, T.; CAMPBELL, I.; SCOTT, F. M. M.; BROWNING, G. F.; MILLER, D.L.; HERRING, A,J.; GREENBERG, H.B. Rotavirus serotypes 6 and 10 predominated in cattle. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 504-507, 1990.

SUPERTI, F.; TINARI, A.; BALDASSARI, L.; DONELLI, G. HT-29 cells: a new substrate for rotavirus growth. **Archives of Virology**, v. 116, n.1-4, p. 159-173, 1991.

TANIGUCHI, K.; URUSAWA, T.; URUSAWA, S. Independent segregation of the VP4 and the VP7 genes in bovine rotaviruses as confirmed VP4 sequences analysis of G8 and G10 bovine rotavirus strains. **Journal of General Virology**, v. 74, p. 1215-1221, 1993.

VONSOVER, A.; SHIFT, I.; SILBERSTEIN, I.; RUDICH, H.; ABOUDY, Y.; MENDELSON, E.; SHULMAN, L.; NAKAGOMI, T.; NAKAGOMI, O. Identification of feline- and canine- like rotaviruses isolated from humans by restriction fragment length polymorphism assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 7, p. 1783-1787, 1993.

WATANABLE, M.; NAKAGOMI, T.; KOSHIMURA,Y.; NAKAGOMI, O. Direct evidence for genome segment reassortment between concurrently-circulating human rotravirus strains. **Archives of Virology**, v.146, n. 3 p. 557-570, 2001.

WHITE, R. G.; MEBUS, C. A.; TWIEHAUS, M. J. Incidence of herds infected with neonatal calf diarrea virus (NCDV). **Veterinary Medicine**, v. 65, p. 487-4 90, 1970.

ANEXO A: soluções utilizadas nos cultivos celulares e nas inoculações de rotavirus

1. Solução ativadora viral (VAS)

Reagente	Quantidade
Acetil – tripsina (pH=7,2)	1,5mL
Meio de Eagle para manutenção	30mL

2. Acetyl- Tripsina pH= 7.2 (Para 20 mL)

Reagente	Quantidade
NaCl	0,16 g
KCl	0,008g
Na2HPO4	0,0012g
KH2PO4	0,0012g
Glicose	0,02g
Tripsina em pó	2,0g
Água Milli-Q q.s.p.	20mL

2.1 Preparo

1. Pipetar aproximadamente 12mL de água deionizada em um frasco. Adiconar, sob agitação, os componentes na orden indicada, exceto a tripsina.

2. Manter o fraco na geladeira até atingir 4°C.

3. Adicionar a tripsina e após 10 minutos, sob agitação, medir o pH, ajustando-o para 7,2.

4. Completar o volume para 20mL de água deionizada e gelada.

5. centrifugar 1.000 g por 1 hora, 4°C.

6. Decantar o sobrenadante e filtrar

7. Efetuar o controle de esterilidade em ágar sangue e sabouraud.

3 PBS (tampão fosfato para lavagem de células)

3.1 Solução A

Reagente	Quantidade
NaCl	8,0g
KCl	0,2g
Na2HPO4	1,15g
KH2PO4	0,2g
H20 Milli-Q q.s.p	800mL

3.2 Solução B

Reagente	Quantidade
CaCl2	0,14g
H2O Milli-Q qs.p.....	100mL

3.3 Solução C

Reagente	Quantidade
$MgCl_2.6H_2O$	0,1g
H_2O Milli-Q qs.p.....	100mL

3.4 Preparo:

Autoclavar a 110oC durante 10 minutos. Após o completo resfriamento, juntar as três soluções

Anexo B: Soluções utilizadas na técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida e coloração do gel

1 Soluções para extração do RNA viral

1.1 Tampão Tris/HCl 0,1M; pH 7,3; para o preparo das fezes.

Reagente	Quantidade
Tris (Base)	12,114 g
$CaCl_2$	0,1662 g
Água Bidestilada	q.s.p. 1000 ml
HCl Concentrado	q.s.p. para pH 7,3

1.2 SDS - 10%

Reagente	Quantidade
Lauril sulfato de sódio	10,0 g
Água bidestilada	q.s.p. 100 ml

1.3 Dissociador de RNA

Reagente	Quantidade
SDS 10%	3,0 ml
Upper - Tris 4x	1,25 ml
2-mercapto-etanol	0,5 ml
Glicerol	4,0 ml
Azul de bromofenol 0,5%	100 μl
Água bidestilada	q.s.p. 10,0 ml

2 Soluções para o preparo do gel de poliacrilamida

2.1 Acrilamida/ Bis-acrilamida (50/1,3)

Reagente	Quantidade
Acrilamida	50,0 g
Bis-acrilamida	1,3 g
Água bidestilada	q.s.p. 100,0 ml

2.2 Lower Tris 4x (1,5M Tris/HCl; pH 8,8)

Reagente	Quantidade
Tris (Base)	18,17 g
HCl concentrado	q.s.p. pH 8,8
Água bidestilada	q.s.p. 100,0 ml

2.3 Upper Tris 4x (0,5M Tris/HCl;pH 6,8)

Reagente	Quantidade
Tris (Base)	6,06 g
HCl concentrado	q.s.p. pH 6,8
Água bidestilada	q.s.p. 100 ml

2.4 Persulfato de amônio (20 mg/ml)

Reagente	Quantidade
Persulfato de Amônio	20 mg
Água bidestilada	q.s.p. 1,0 ml

2.5 Gel de poliacrilamida

	Quantidade de Reagente	
	Gel de corrida 7,5%	Gel de empilhamento 3,5%
Solução Mãe de aAcrilamida/Bis-acrilamida	1,02 mL	0,14 ml
Lower Tris 4x	1,75 mL	---------
Upper Tris 4X	-------	0,5mL
H2O bidestilada	4,02 mL	1,5 mL
Persulfato de amônio	200 μl	50μl
TEMED	10 μl	10 μl

3 Soluções para o preparo do tampão de corrida

3.1Solução estoque Tris-glicina 4x (solução-mãe)

Reagente	Quantidade
Tris (Base)	12,0 g
Glicina	57,6 g
Azida Sódica 10%	10, 0 ml
Água bidestilada	q.s.p. 1000 ml

3.2 Tampão de corrida (ppdt)

Reagente	Quantidade
Tris-glicina 4x	60 ml
Água bidestilada	180 ml

4 Soluções utilizadas na revelação do gel por nitrato de prata

4.1 Etanol-ácido acético

Reagente	Quantidade
Etanol	10 ml
Ácido acético	0,5 ml
Água bidestilada	q.s.p. 100 ml

4.2 Nitrato de Prata 0,011 M

Reagente	Quantidade
Nitrato de prata	0,185 g
Água bidestilada	q.s.p.100 ml

4.3 Solução Reveladora

Reagente	Quantidade
NaOH	3,75 g
Formaldeído (40%)	0,95 ml
Água bidestilada	q.s.p.125 ml

4.4 Ácido acético 5%

Reagente	Quantidade
Ácido acético	5 ml
Água bidestilada	q.s.p. 100 ml

4.5 Etanol 10%

Reagente	Quantidade
Etanol	10 ml
Água bidestilada	q.s.p.100 ml