



UFAM

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA**

**DESENVOLVIMENTO DE FERRAMENTAS DE DETECÇÃO DAS
PROTEÍNAS VP4 E VP6 PARA IMUNODIAGNÓSTICOS DE
ROTAVÍRUS DO TIPO A**

LEIDIANE AMORIM SOARES GALVÃO

**MANAUS - AM
2014**



UFAM

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA**

LEIDIANE AMORIM SOARES GALVÃO

**DESENVOLVIMENTO DE FERRAMENTAS DE DETECÇÃO DAS
PROTEÍNAS VP4 E VP6 PARA IMUNODIAGNÓSTICOS DE
ROTAVÍRUS DO TIPO A**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia, da Universidade Federal do Amazonas, como requisito avaliativo para obtenção do título de doutorado em Biotecnologia.

**Orientadora: Dra. Patrícia Puccinelli Orlandi.
Co-orientador: Dr Luís André Morais Mariúba.**

**MANAUS - AM
2014**

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

G182d Galvao, Leidiane Amorim Soares
Desenvolvimento de ferramentas de detecção das proteínas VP4 e VP6 para imunodiagnósticos de rotavírus do tipo A / Leidiane Amorim Soares Galvao. 2014
87 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Patrícia Puccinelli Orlandi
Coorientador: Luís André Morais Mariúba
Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Proteína recombinante. 2. Anticorpo policlonal. 3. Citometria de fluxo. 4. Rotavírus A . I. Orlandi, Patrícia Puccinelli II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

AGRADECIMENTOS

Ao Programa PPGBIOTEC, pela oportunidade, pelo apoio aos alunos, organização e qualidade. A Secretaria do programa em nome de Nubiane Truycy, obrigada pela paciência, gentileza e profissionalismo com as quais sempre me tratou e trata meus colegas.

Ao CNPq pelo apoio com ajuda financeira para compra de material e bolsa de estudos.

A Fiocruz – AM por abrir as portas para formação de novos mestres e doutores, pelo espaço físico e investimento financeiro na pesquisa.

Aos meus orientadores: Dra. Patrícia, Dr. Luís André, Dr. Paulo, obrigada pela oportunidade, confiança e conhecimento prestados nos últimos anos.

A minha mãe, obrigada por ser a minha raiz, sei o quanto enfrentou desafios para me proteger, me criar, me garantir educação. Obrigada por esse orgulho que têm de mim, pelo carinho, palavras de conforto e amor.

Aos meus irmãos, Rebeca e Rodrigo que às vezes achavam que eu estava “pirando” obrigada pela torcida à longa distância, distante só fisicamente mais meu coração sempre pertinho de vocês.

A família materna, vovó Giza, tios, tias obrigada pela torcida, pelo apoio, pela educação e paciência. As minhas queridas Sônia e Léia, minhas amigas que apostaram no meu potencial, me fizeram acreditar que de fato sou importante, sou especial. Especial e importante são vocês que me ajudaram no momento que precisei amo vocês. A família Amorim de Manaus, Ernandes, Cinara e Natália, obrigada pelo apoio, pela hospitalidade e generosidade que tiveram conosco desde nossa chegada em Manaus.

A família paterna, vovó Carmélia (*in memorian*) a senhora se foi e deixou saudades que bom ter conseguido lhe contar os passos que já havia dado na vida. Obrigada por pelo apoio em prol da minha educação.

Aos colegas de Laboratório, obrigada pela torcida, pelas conversas, piadas, ajuda braçal e momentos que só nós sabemos a importância enquanto insistimos em fazer funcionar ensaios que muitas vezes eram repetidos e repetidos. Aos amigos que pegaram no pesado comigo: Luciana, Davi, Edilene, André, Jenifer, Lucas. Obrigada por terem sido a mão, os dedos e os braços fortes que precisei nos inúmeros testes e tentativas de fazer funcionar.

As minhas meninas da equipe Rotavírus: como fomos guerreiras, sinto falta de nossa convivência, obrigada pela paciência, pelo apoio, pela atenção em favor de nossos projetos. Karen, Neide, Geise e Michele minhas “filhas” cuidaram de mim e do Gui quando ainda na barriga, obrigada por todo carinho.

Aos amigos de PVH e de outros lugares obrigada pela torcida e votos de fé.

Descobri com o passar dos anos que tenho a capacidade de atrair muitas pessoas ao meu redor, nesse tempo em Manaus fui presenteada pelo afeto, carinho e atenção de muitos, aos meus queridos amigos que me estenderam a mão e em grupo me concederam momentos felizes digo que contem comigo sempre. A verdadeira amizade reflete-se em trocas sinceras. A vocês que sabem disso que vos falo, obrigada.

DEDICO

Aos meus dois amores Lenilson e Luís Guilherme.

“A você Lenilson, meu companheiro, de todas as horas e momentos, você é meu porto seguro, está sempre ao meu lado para que as barreiras sejam vencidas. Ao seu lado, o peso fica mais leve. Obrigada meu amor por ser esse homem tão maravilhoso”.

Ao meu filho, Luís Guilherme, por ter sido a força que precisei para prosseguir a jornada. Minha melhor inspiração.

“Você chegou no momento certo, com você aprendo a cada dia a ser uma pessoa melhor”.

Amo vocês!

“E no meio do inverno eu descobri que dentro de mim havia um verão invencível”.

Rubem Alves

“Sabe o que eu quero de verdade? Jamais perder a sensibilidade mesmo que às vezes ela arranhe um pouco a alma. Porque sem ela não poderia sentir a mim mesma...”.

Clarice Lispector

ÍNDICE

1.INTRODUÇÃO	16
1.1 DOENÇAS DIARREICAS.....	16
1.2 ROTAVÍRUS-HISTÓRICO.....	16
1.3 EPIDEMIOLOGIA DE ROTAVÍRUS NO MUNDO.....	17
1.3.1 Epidemiologia de Rotavírus no Brasil.....	18
1.4 ASPECTOS CLÍNICOS.....	21
1.5 ESTRUTURA E CARACTERIZAÇÃO ANTIGÊNICA DO ROTAVÍRUS	21
1.5.1 Rotavírus Sorogrupo A (RV-A).....	23
1.5.2 VP4 – Proteína Viral 4.....	24
1.5.3 VP6 – Proteína Viral 6.....	25
1.6 DIAGNÓSTICO ROTAVÍRUS – PATENTES E PRODUTOS.....	26
2.OBJETIVO GERAL	29
2.1 Objetivos específicos.....	29
3.METODOLOGIA	31
3.1 DESCRIÇÃO DO ESTUDO.....	31
3.2 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA.....	31
3.3 ETAPAS PARA DESENVOLVIMENTO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE VP4 E DE ANTICORPOS POLICLONAIS ANTI-VP4.....	32
3.3.1 Organograma.....	32
3.4 ETAPAS PARA DESENVOLVIMENTO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE VP6 E DE ANTICORPOS POLICLONAIS ANTI-VP6.....	33
3.4.1 Organograma.....	33
3.5 ETAPAS PARA CLONAGEM DE VP4.....	33
3.5.1 Cepa Padrão.....	33
3.5.2 Cultivo Celular MA ₁₀₄ e Infecção por Rotavírus – WA.....	33
3.5.3 Extração do RNA Genômico.....	34
3.5.4 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (PAGE).....	34
3.5.5 Gene Alvo e iniciadores.....	35
3.5.6 Reação em Cadeia Polimerase precedida de Transcrição Reversa RT- PCR, para genótipo P de Rotavírus.....	35
3.5.7 Eletroforese em gel de agarose e purificação de DNA.....	35

3.6 Clonagem.....	36
3.6.1 Ligação ao vetor de clonagem.....	36
3.6.2 Plasmídeo de Clonagem: pGEM [®] -T Easy Vector	36
3.6.3 Preparação da célula competente para inserção do plasmídeo recombinante – Transformação TOP 10.....	37
3.6.4 Transformação e Seleção de colônias.....	37
3.7 SEQUENCIAMENTO.....	38
3.8 PRODUÇÃO DA VP6.....	38
3.8.1 Desenho do gene sintético.....	38
3.9 SUBCLONAGEM pGEM-VP4 e pSMART-VP6 EM VETOR DE EXPRESSÃO pRSET.....	40
3.9.1 Digestão com enzimas de restrição do pGEM-VP4.....	40
3.9.2 Digestão com enzimas de restrição do pSMART-VP6.....	40
3.10 CEPAS BACTERIANAS USADAS NA SUBCLONAGEM.....	41
3.10.1 Plasmídeo de Expressão – pRSETA.....	42
3.10.2 Plasmídeo de Expressão – pRSET B.....	43
3.10.3 Transformações e Verificação do correto sentido de leitura.....	44
3.10.4 Transformação de células eletrocompetentes (<i>E.coli</i> BL21 DE3 pLYSS	44
3.10.5 Cultivo e Indução das proteínas VP4 e VP6 recombinantes.....	44
3.11 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS EM GEL SDS-PAGE.....	45
3.12 WESTERN BLOT.....	45

3.13 PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES.....	46
3.14 IMUNIZAÇÕES DE CAMUNDONGOS BALB/C E COELHO.....	46
3.15 VALIDAÇÃO DOS ANTICORPOS POLICLONAIIS PRODUZIDOS, A PARTIR DA CONSTRUÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES	47
3.15.1 <i>Western blots</i>	47
3.16 CITOMETRIA DE FLUXO.....	47
3.16.1 Marcação de células para leitura em citometria de fluxo.....	47
4. RESULTADOS	50
4.1 Produção do antígeno recombinante VP4.....	50
4.1.2 Clonagem e subclonagem da proteína VP4.....	50
4.1.3 Expressão e purificação do antígeno recombinante VP4	51
4.2 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIIS – ANTI -VP4.....	52
4.2.1 ANTI-VP4 coelho e camundongos.....	52
4.3 PRODUÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE VP6.....	52
4.3.1 Subclonagem do gene VP6-pRSETA.....	54
4.4 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DO ANTÍGENO RECOMBINANTE VP6.....	54
4.5 PRODUÇÃO DOS ANTICORPOS POLICLONAIIS.....	54
4.5.1 Anti-VP6 coelho e camundongos.....	54
4.6 TESTES PARA VALIDAÇÃO DOS ANTICORPOS POLICLONAIIS PRODUZIDOS A PARTIR DA CONSTRUÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES.....	55
4.6.1 <i>Western blot</i> com amostra Rotavírus WA e anti-VP4 e anti VP6.....	55

4.7 ANÁLISE DE ANTI-VP4 E ANTI-VP6 DE COELHO POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	56
4.7.1 Caracterização dos IgG's anti-VP4 de coelho.....	56
4.7.2 Caracterização dos IgG's anti-VP6 de coelho.....	57
5.DISSCUSSÃO.....	60
6.CONCLUSÃO.....	66
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68
8. ANEXOS.....	83

Anexo 1: Parecer do Comitê de ÉTICA Animal

Anexo 2: Artigo

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Organização estrutural de Rotavírus Fonte: (DESSELBERGER et al., 2009).

FIGURA 2: Sequência e mapa do plasmídeo de clonagem pGEM. Fonte: (Manual Técnico Promega – 12/10).

FIGURA 3: Desenho do gene sintético.

FIGURA 4: Gene VP6-pSMART. Fonte: (IDT- INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES).

FIGURA 5: Sequência e Mapa do Plasmídeo de Expressão pRSET-A. Fonte: (Manual Técnico Invitrogen (Catálogo V 351-20)).

FIGURA 6: Sequência e Mapa do Plasmídeo de Expressão pRSET-B. Fonte: (Manual Técnico Invitrogen (Catálogo V 351-20)).

FIGURA 7: Etapas de clonagem e subclonagem do fragmento VP4.

FIGURA 8: Expressão da proteína VP4.

FIGURA 9: Imunogenicidade da proteína VP4.

FIGURA 10: Subclonagem de VP6 em pRSETA.

FIGURA 11: Expressão de proteína VP6 após 3 horas com indutor IPTG.

FIGURA 12: Imunizações com a proteína recombinante VP6 em coelho e camundongos.

FIGURA 13: *Western blot* com amostras Rotavírus Wa e anti-VP4 e anti-VP6.

FIGURA 14: Caracterização de IgG de coelho anti-VP4.

FIGURA 15: Caracterização dos anticorpos anti-VP6 em cultura in vitro de Rotavírus.

LISTA DE QUADROS:

QUADRO 1: Cepas bacterianas e Plasmídeos utilizados para a clonagem de VP4 Rotavírus.

QUADRO 2: Cepas bacterianas e Plasmídeos utilizados para a clonagem de VP6 e VP4 Rotavírus.

SIGLAS:

OMS	Organização Mundial de Saúde
UNICEF	United Nation Children Found
DDA	Doença Diarréica Aguda
MDDA	Monitorização das doenças diarreicas agudas
SUS	Sistema Único de Saúde
RVS	Rotavírus
ICTV	Comitê Internacional de taxonomia dos vírus
EUA	Estados Unidos da América
SVS	Sistema de Vigilância Sanitária
SNVS	Sistema Nacional de vigilância em saúde
MS	Ministério da saúde
TRO	Terapia de reidratação oral
CDC	Centers for diseases control and prevention
IGg	Imunoglobolína G
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
IPTG	Isopropílico β -D-1-thiogalactopyranoside
nm	Nanômetros
RNA	Ácido ribonucleico
VP	Proteína viral
PAGE	Eletroforese em gel de Poliacrilamida
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
TRIS/HCL	Hidroximetil Aminometano / ácido clorídrico
NSP	Proteína não estrutural
RPM	Rotação por Minuto
INPI	Instituto nacional de propriedade intelectual
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SLP	Partícula de camada simples
VP6	Proteína viral 6
TBE	Tampão Tris Acido Bórico-EDTA
VP7	Proteína viral 7
VP4	Proteína Viral 4
WHO	World Health Organization
RT	Transcriptase Reversa
TBE	Tris Borato EDTA
ELISA	Ensaio imunoenzimático
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DMEM	Meio eaglen modificado por dubecco
PAGE	Gel de poliacrilamida
pH	Potencial Hidrogeniônico
TBE	Tris Borato EDTA
UV	Ultravioleta
DO	Densidade óptica

XGAL	Galactose
LB	Luria bertani broth
IDT	Integrated DNA Technologies
TLP	Tripe layered particle
DLPs	doble-layered particle
SLPs	<i>single-layered particles</i>

RESUMO

Devido as crescentes taxas de morbidade e mortalidade causada por Rotavírus humanos, métodos de detecção têm sido empregados rotineiramente em estudos clínicos epidemiológicos. O diagnóstico das infecções por Rotavírus baseia-se na detecção das partículas, antígenos ou RNA virais a partir de material fecal. O objetivo deste estudo foi desenvolver ferramentas de detecção das proteínas VP4 e VP6 para imunodiagnósticos de Rotavírus do tipo A. IgG de coelho e camundongos anti-VP4 e anti-VP6 foram obtidos a partir de imunizações feitas com as proteínas recombinantes VP4 e VP6 de Rotavírus A (ambas construídas neste estudo) e testados através de citometria de fluxo e *western blot* contra o antígeno recombinante e o antígeno nativo. A região da proteína VP4 selecionada para a geração de IgG de camundongo e coelho anti-VP4 foi eficiente para o reconhecimento do antígeno nativo em sua forma desnaturada, como foi possível observar nos ensaios de *western blot*. As análises de citometria demonstraram que os mesmos anti-VP4 gerados não foram específicos o suficiente para serem utilizados em técnicas onde a proteína VP4 está em sua forma nativa. As regiões selecionadas para a produção da proteína VP6 foram eficientes para a geração de anticorpos anti-VP6 capazes de reconhecer a proteína nativa em sua forma desnaturada e não desnaturada. Futuros trabalhos terão como objetivo o aumento da especificidade dos anticorpos obtidos de modo a permitir sua aplicação em um maior número de imunoenaios.

Palavras Chaves: proteína recombinante, VP4, VP6, anticorpo policlonal, citometria de fluxo, *western blot*.

ABSTRACT

Due to rising rates of morbidity and mortality caused by human rotavirus, detection methods have been used routinely in clinical and epidemiological studies. The diagnosis of rotavirus infections is based on the detection of particles, antigens or viral RNA from the fecal material. This study aimed to develop the VP4 and VP6 protein detection tools for immunodiagnostic of Rotavirus group A. Rabbit and mice anti-VP4 and anti-VP6 IgGs were obtained from immunizations made with VP4 and VP6 recombinant proteins of Rotavirus A, both built in this study, and tested by flow cytometry and Western blot against the recombinant antigen and the native antigen. The region of the VP4 protein, selected for the generation of mice and rabbit anti-VP4 IgGs, was efficient to recognize native antigen in denatured form, as observed in western blot assays. The cytometry analysis demonstrated that generated anti-VP4 antibodies were not specific enough to be used in techniques where the VP4 protein is in its native form. Selected regions for production of VP6 protein have been efficient for the generation of anti-VP6 antibodies, able to recognize the native protein in its denatured and non-denatured form. Future studies will aim to increase the specificity of the antibodies obtained to allow their use in a greater number of immunoassays.

Key words: recombinant protein, VP4, VP6, polyclonal antibody, flow cytometry, western blot.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 DOENÇAS DIARREICAS

De acordo com dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), as doenças diarreicas são classificadas como uma das doenças de maior impacto para a saúde pública ao nível mundial. O relatório anual de 2013 da OMS, juntamente com a *United Nation Children Found* (UNICEF), mostram que a cada ano em países em desenvolvimento são registrados 2 bilhões de casos de doenças diarreicas e 1,9 milhões de crianças com menos de 5 anos de idade morrem em virtude da diarreia (OMS & UNICEF, 2013). Na região das Américas da OMS a DDA (Doença Diarreica Aguda) é responsável por 7% das mortes durante a infância e representa 3% do índice brasileiro de mortalidade infantil por ano (OMS, 2012).

A Monitorização das Doenças Diarreicas Agudas (MDDA), notificou cerca de 2 milhões de casos de diarreia em crianças entre 0 a 10 anos no Brasil, com mais de 50 mil óbitos por DDA entre os anos de 2000 e 2010.

A diarreia de caráter infeccioso é a mais importante para o sistema público de saúde, devido a sua maior frequência (MS, 2010). Os sintomas comuns observados no doente é o aumento do número de evacuações, com fezes aquosas ou de pouca consistência. Em alguns casos, há presença de muco e sangue (característica geralmente de gastroenterite de origem bacteriana), podendo ser acompanhadas de náusea, vômito, febre e dor abdominal. No geral, possui duração de 2 a 14 dias e as formas variam desde leves até graves, com desidratação e distúrbios eletrolíticos, principalmente quando associadas à desnutrição (PORTAL DA SAÚDE SUS, 2014). Os principais agentes causadores de diarreia são: bactérias, vírus e parasitos, podendo ser de origem infecciosa e não infecciosa. Dentre esses agentes infecciosos, tanto nos países industrializados como em desenvolvimento, os vírus são causa predominante de diarreia. E dentre esses, o Rotavírus (RVs) é considerado o principal agente etiológico de diarreia aguda grave na infância (VESIKARI, 2012; DUSSETY, 2013).

1.2 ROTAVÍRUS - HISTÓRICO

Os primeiros relatos que relacionavam à participação de agentes virais em doenças diarreicas ocorreram em 1942. Os autores induziram a doença em bezerros jovens através de inoculação por via oral, utilizando filtrado de fezes de crianças com

quadro de diarreia não bacteriana, que havia ocorrido em berçários de Baltimore e Washington (LIGTH e HODES 1943). Em 1972, Kapikian e colaboradores, utilizando a técnica de imunomicroscopia eletrônica, demonstraram a presença de partículas virais com 27 nanômetros (nm) de diâmetro em filtrado de fezes diarreicas durante um surto de diarreia não bacteriana ocorrida em Norwalk, Ohio, EUA. Esses vírus foram denominados vírus Norwalk que representa um grupo diverso de vírus, atualmente classificado na família Caliciviridae (*International Comitee Taxonomy of Viruses*, 2006).

Bishop e colaboradores (1973) descreveram pela primeira vez a presença de Rotavírus em humanos, através de cortes ultrafinos de biópsias da mucosa duodenal de crianças com diarreia aguda não bacteriana. Utilizando a microscopia eletrônica, os autores observaram a presença de partículas virais em seis dos nove casos estudados e devido a sua morfologia sugeriram tratar-se de um vírus pertencente ao grupo Orbivírus. No mesmo ano Flewett e colaboradores observaram pela primeira vez por microscopia eletrônica partículas de vírus diretamente das fezes de crianças com diarreia aguda. Eram partículas com duplo capsídeo tornando-se muito semelhante aos Reovírus, que posteriormente passou a ter a denominação de Rotavírus, anteriormente denominado *Reovirus-like*, pois as partículas virais apresentavam morfologia semelhante a uma roda (latim “rota”), quando observadas em microscópio eletrônico (BISHOP et al., 1973; FLEWETT et al., 1973). Essa denominação como gênero Rotavírus viria a ser definida como oficial em 1978 pelo Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus (I.C.T.V), durante o 4º Congresso Internacional de Virologia (MATTHEUS et al., 1979).

1.3 EPIDEMIOLOGIA ROTAVÍRUS NO MUNDO

As gastroenterites humanas são classificadas como uma das doenças de maior impacto na saúde a nível mundial, principalmente na faixa etária infantil. De acordo com dados do relatório anual da OMS em 2011, embora as taxas de mortalidade infantil tenham sido reduzidas ao longo dos últimos anos as doenças diarreicas permanecem como uma das principais causas de morbidade e mortalidade infantil em todo o mundo, principalmente em países em desenvolvimento.

A doença diarreica aguda (DDA) contabiliza anualmente 15% do total de óbitos na faixa etária infantil, o que equivale a aproximadamente um milhão e duzentas mil mortes por ano. Na região das Américas da OMS a DDA é responsável por 7% das

mortes durante a infância e representa 3% do índice brasileiro de mortalidade infantil. A cada ano, a nível mundial, 125 milhões de doenças diarreicas são causadas por Rotavírus, estima-se que 352 mil a 592 mil mortes acometem crianças com idade até 5 anos (PATTON JT., 2012).

Mesmo em países desenvolvidos, onde prevalecem condições satisfatórias de saneamento, o Rotavírus se reveste de importância epidemiológica; no Estados Unidos da América (EUA), por exemplo, associam-se a 3% de todas as hospitalizações envolvendo crianças menores de 5 anos de idade. O Rotavírus representa a causa mais comum de diarreia grave na infância em todo o mundo. Nos países em desenvolvimento, particularmente, estima-se que as gastroenterites associadas a esses agentes virais determinem 600.000 a 870.000 mortes a cada ano (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE 2010). Dados refletem 20 a 25% do total de óbitos por doença diarreica, sendo que 6% da mortalidade global ocorrem entre crianças com idades inferiores há cinco anos.

1.3.1 Epidemiologia Rotavírus no Brasil

Na América Latina, os Rotavírus, são descritos como causa importante de diarreia, de acordo com dados da Monitorização das Doenças Diarreicas Agudas (MDDA), foram notificados cerca de 33 milhões de casos de diarreia, com mais de 49 mil óbitos por DDA entre os anos de 2000 e 2011(MS, 2010). A primeira descrição de Rotavírus no Brasil foi feita por Linhares e colaboradores em 1977, utilizando a técnica de microscopia eletrônica, os autores demonstraram a presença de partículas de Rotavírus nas fezes de duas de 13 crianças com diarreia aguda admitidas em um Hospital Público na cidade de Belém do Pará.

No Brasil em algumas regiões o perfil de sazonalidade é variável, estudos mostram aumento no índice de casos de Rotavírus em meses mais frios ou no período de seca. Nas regiões Norte e Nordeste a ocorrência de Rotavírus se distribui durante todo o ano. Estudos realizados nos últimos dez anos no Brasil mostraram a circulação dos genótipos mais comuns de Rotavírus: (G1, G2, G3, G4 e P[4], P[6] e P[8]), observando-se maior incidência de Rotavírus tipo G1P[8] e a emergência do tipo G9, a partir de 1998 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

A presença de múltiplos tipos G e ou P nas amostras baseia-se em infecções com mais do que um tipo de Rotavírus o que favorece a chance de rearranjos genéticos

durante infecções. A frequente busca dos genótipos circulantes na população é necessária para detecção de novas cepas, inclusive após a introdução da vacina (LEITE et al., 1996).

Assim como em outros países, no Brasil a rotavirose acomete principalmente crianças menores de cinco anos de idade, com prevalências que variam de 20 a 70 por cento, entre as regiões do país (MS, 2011). Como o Brasil possui uma grande extensão territorial com diferenças climáticas, sociais e culturais, diferentes dinâmicas de comportamento do agravo entre as distintas regiões são observadas (LINHARES A. C. 2000).

Nas regiões Norte e Nordeste devido as suas temperaturas médias anuais mais elevadas, a infecção pelo Rotavírus não possui um perfil sazonal marcado, ocorrendo durante todos os meses do ano. Para as regiões Centro-Oeste, Sul e Sudeste a maior incidência da rotavirose segue o perfil observado em países de clima temperado, nos quais as maiores incidências ocorrem nos meses mais secos e frios (CARMO et al., 2011). Outros fatores, como as diferenças socioeconômicas entre as regiões do país, exercem influências sob as faixas etárias acometidas pela doença. Deste modo, essa não é a mesma em todo o território nacional (MUNFORD et al., 2009). Há lugares no Brasil onde a população possui um maior acesso aos serviços de saúde e melhores condições de vida, como as regiões Sul, Sudeste e Centro-oeste. Nestas localidades, a idade de maior incidência do agravo é semelhante de países desenvolvidos, como o Estados Unidos, nos quais as faixas etárias acometidas são crianças após o primeiro ano de vida (SARTORI et al., 2008). Em contrapartida, regiões menos desenvolvidas, as principais vítimas são crianças entre três e onze meses de vida (LINHARES A. C. 2000).

A gravidade da doença é mais marcante nas regiões Norte e Nordeste, visto que as condições nutricionais e sanitárias são mais precárias, acarretando um maior número de óbitos. Entretanto, a mortalidade devido à rotavirose e por outras causas de diarreias tiveram uma redução nas últimas décadas, devido à melhoria nas condições nutricionais das crianças, melhoria de hábitos de higiene, incentivo à amamentação e a adoção da terapia de reidratação oral (TRO) (MS, 2011). Todavia, episódios diarreicos repetidos podem ocasionar desnutrição crônica, com retardo do desenvolvimento estado-ponderal e, até mesmo, da evolução intelectual (SECRETARIA DO ESTADO DE SAÚDE DE SÃO PAULO, 2006). Apesar dos importantes avanços alcançados na prevenção e controle das doenças infecciosas, as doenças diarreicas agudas ainda continuam como

um dos principais problemas de saúde pública e um grande desafio às autoridades sanitárias (*CENTERS FOR DISEASES, CONTROL AND PREVENTION (CDC)*, 2012).

Segundo o Ministério da Saúde, no período 2006 a 2009 no Brasil, o Rotavírus representou 30% total de casos de DDAs em relação aos outros vírus entéricos. Entre as regiões do país, o Rotavírus representou 35% dos casos de DDAs na região norte, 26% dos casos na região nordeste e 21%, 17% e 20% dos casos de DDAs nas regiões Centro-oeste, Sudeste e Sul, respectivamente (MS, 2010).

Em estudos realizados por Orlandi e colaboradores (2006) na região Norte (Rondônia) em 2005 e 2006, foi possível estabelecer um quadro mais esclarecedor sobre a participação dos enteropatógenos associados às diarreias. Rotavírus foi o principal patógeno encontrado, com índices de 23,0% em crianças de 0 a 6 anos de idade.

Já em período pós-vacina, a equipe mostrou a ocorrência de uma leve queda nos índices de rotavirose, de 591 amostras diarreiogênicas coletadas, (103) 17,3% foram consideradas positivas para Rotavírus, de acordo com a pesquisa das 591 amostras 302 foram consideradas procedentes de crianças vacinadas contra Rotavírus e das imunizadas 42 estavam infectadas e os demais 61 não foram vacinados (C. A. SANDRA et al., 2013). Esses dados reforçam a importância em monitorar os genótipos circulantes, exercendo assim garantia para ação de novas vacinas, além disso, sustenta a ideia da fiscalização de possíveis infectados, a fim de que esses possam ser tratados de maneira eficiente, resultando em segurança para formação de novas cepas, com reagrupamentos gênicos.

No ano de 2010 os casos de Rotavírus no Brasil foram de 39,6% de um total de 3.418 casos suspeitos, na região Norte, mais especificamente no Acre o percentual de amostras positivas para Rotavírus foi de 17,9% de um total de 85 casos suspeitos (SISTEMA NACIONAL DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2011).

Dados do Ministério da Saúde, 2010, revelam que no Amazonas, foram notificados 253 casos suspeitos de Rotavírus, destes, 90,1% (228) tiveram amostras coletadas e 46,6% (118) foram confirmados. Em relação ao ano de 2012, a MDDA já registrou 874.768 casos de DDA no Brasil, sendo 75.463 em menores de 1 ano, 196.662 casos entre 1 a 4 anos, 98.283 entre 5 a 9 anos, 495.564 em maiores de 10 anos e 8.796 ignorados (MS, 2011).

1.4 ASPECTOS CLÍNICOS

Os Rotavírus são de fácil transmissão, tanto em ambiente hospitalar quanto em ambiente familiar por ocorrer basicamente via fecal-oral, mas há registros de que esta transmissão possa ocorrer via aerossóis, utensílios contaminados, alimentos e água contaminados, além de secreções do trato respiratório de alguns pacientes contaminados com Rotavírus, visto que o índice de casos aumenta em períodos do ano, onde o clima está mais frio e a população tende a se aglomerar (OLIVEIRA et al, 1999).

Nas infecções por Rotavírus, observa-se um espectro que abrange as formas assintomáticas, subclínicas e o quadro clássico, em geral é caracterizado pelo início abrupto de vômitos e febre alta, sobrevivendo à diarreia profusa (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE 2010). Esses sintomas, dependendo da intensidade, culminam com a desidratação do tipo isotônica, considerada como o principal determinante de óbito por esses agentes entre crianças no seu primeiro ano de vida (OLIVEIRA et al., 1999).

Os vômitos estão presentes em 50% dos casos, e em geral são intensos, podendo ser irrefreável ou manifestar-se isoladamente, com duração prolongada, a maior frequência de vômitos nos quadros diarreicos, está associado aos Rotavírus, isso se compararmos a outros quadros clínicos idênticos, mais que são causados por outros enteropatógenos (KAPIKIAN et al., 2002). Os mecanismos através dos quais os Rotavírus exercem a sua ação patogênica, ainda não estão bem definidos. Sabe-se que a replicação ocorre principalmente na mucosa do jejuno, mais precisamente nas células epiteliais maduras que revestem as vilosidades, onde se dá a absorção (FERNANDES et al., 2002).

1.5 ESTRUTURA E CARACTERIZAÇÃO ANTIGÊNICA DO ROTAVÍRUS

Os Rotavírus pertencem ao gênero *Rotavirus* e família *Reoviridae*. Estruturalmente a partícula viral é composta por três camadas, o que resulta em três tipos diferentes de partículas proteicas com tamanho em diâmetro 70 nm. A camada proteica mais externa é denominada de cápside externo. A partícula sem a camada externa é denominada cápside intermediário ou partícula rugosa, devido às projeções proteicas do cápside interno. E o terceiro tipo de partícula observada, é denominado de partícula de camada simples, também conhecida como "core", à qual o RNA genômico associa-se (ESTES e KAPIKIAN, 2007).

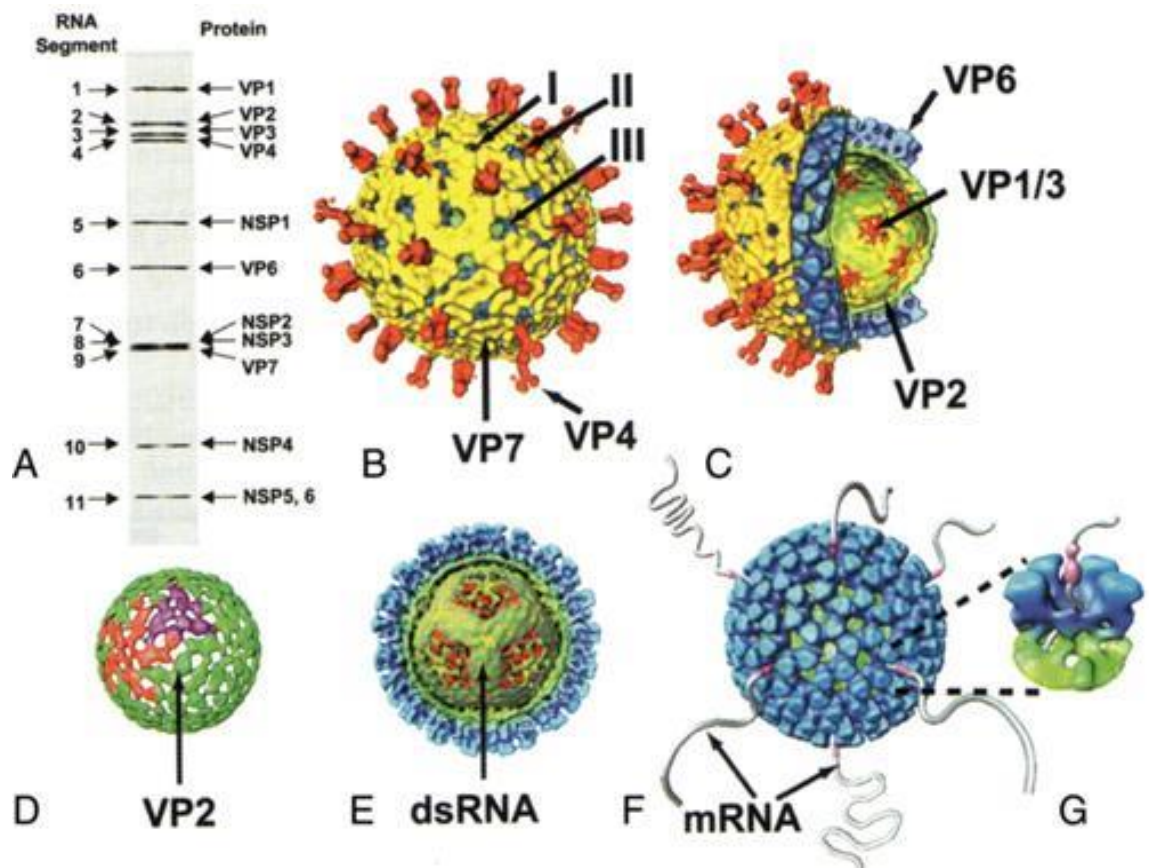


Figura 1: Organização estrutural de Rotavírus.

Fonte: DESSELBERGER et al., 2009.

O Rotavírus é composto por onze segmentos de RNA de dupla fita, onde cada segmento genômico, codifica uma proteína viral exceto o segmento onze que codifica duas proteínas, totalizando seis proteínas estruturais, denominadas proteína viral, e seis proteínas não estruturais, denominadas NSP (*non-structural protein*). No capsídeo interno, estão dispostas as proteínas VP1, VP3 e VP2, sendo que as duas primeiras estão intimamente associadas ao genoma viral. O capsídeo intermediário é formado pela proteína VP6 e o externo pelas proteínas VP4 e VP7. As proteínas não estruturais do Rotavírus são denominadas NSP1 a NSP6 (Figura 1) (PATTON, 1995; ESTES e KAPIKIAN, 2007).

As proteínas, VP7 e VP4 são reconhecidas como indutoras de anticorpos neutralizantes. A primeira se constitui em uma glicoproteína relacionada ao gene 7, 8 ou 9 enquanto a segunda, com síntese regulada pelo segmento genômico 4, revela-se sensível a protease (PARASHAR et al., 1998).

1.5.1 Classificação dos Rotavírus grupo A

Existem sete grupos que classificam o Rotavírus, tais grupos são denominados A, B, C, D, E, F e G. Os Rotavírus dos grupos A, B, e C foram identificados como agentes de diarreia aguda em humanos, sendo o grupo A o mais comum em todo o mundo. A caracterização das estirpes do Rotavírus A em sorotipos e genótipos é possível devido a diversidade antigênica das proteínas estruturais VP6, VP4 e VP7, que encontram-se na camada intermediária e na camada externa do capsídeo respectivamente. Tradicionalmente e com base na caracterização da glicoproteína VP7 (G tipo) ou da proteína VP4 (P tipo), protease sensível, o RV-A classifica-se por um sistema binário (KAPIKIAN e HOSHINO; CHANOCK, 2001).

Entretanto, a partir de análises molecular das sequências dos genes estruturais e não estruturais de Rotavírus foi possível estabelecer um quadro amplo de classificação baseada não somente em VP7 e VP4, mais também em VP1, VP2, VP3, NSP1, NSP2, NSP3 ou NSP5, além da análise molecular de VP6 que especifica os sub-grupos de Rotavírus (Iturriza Gomara et al., 2002)

De acordo com estudos, até 2009 haviam sido descritos 23 G tipos e 31 P tipos em estirpes de Rotavírus identificadas em seres humanos e em várias espécies de animais, incluindo mamíferos e aves. Essa diversidade de genótipos demonstra a extensa variabilidade antigênica e molecular desse sorogrupo de Rotavírus (PARRA et al., 2007; ABE et al., 2009).

As caracterizações dos diferentes tipos de Rotavírus são importantes para definir a diversidade das cepas virais circulantes em um determinado tempo e local, já que estudos indicam que sorotipos e genótipos encontrados variam de acordo com a sazonalidade de determinada região. Além disso, comparações de cepas de Rotavírus de origem humana e de origem animal podem fornecer conhecimento sobre a evolução deste vírus entre as espécies animais (RACZ et al., 2000).

A genotipagem através de estudos moleculares é a ferramenta mais fácil e eficaz para a definição dos múltiplos genótipos de diversos organismos, especialmente dos Rotavírus, que nos últimos anos tem sido registrado aumento na variedade de estirpes circulantes. (GOUVÊA et al., 1990; WINIARCZYK et al., 2002).

1.5.2 Proteína do capsídeo externo VP4

VP4 é uma proteína não glicosilada e forma espículas que se projetam na superfície do Rotavírus (VINCENT ENOUF et al, 2003), por conta das espículas projetadas nas bordas dos canais nas regiões do eixo do pentâmero do Rotavírus, o diâmetro total da partícula viral do vírus fica em 100 nm (FAUQUET et al, 2007) Essa proteína era anteriormente denominada de VP3 e, após a descrição dos produtos proteicos dos genes 3 e 4, esta proteína passou a ser chamada de VP4 uma vez que corresponde ao produto do gene 4 (MUNFORD, 2007). VP4 determina os sorotipos e genótipos P, pelo fato de ser sensível a protease e possui diferentes funções no ciclo de vida do vírus, incluindo adesão à célula, internalização, hemaglutinação, neutralização e virulência (LIPRANDI et al., 2003). Possui ainda um sítio de clivagem pela tripsina, produzindo dois fragmentos VP8 e VP5 (PRASAD e CHIU, 1994), A clivagem proteolítica provavelmente estabiliza o conjunto de espículas, conferindo ordenamento icosaédrico, o que caracteriza o vírus em aspecto morfológico, tendo como resultado uma potencialização da infectividade viral e a permeabilidade da membrana induzida por Rotavírus (EVGENIYA DENISOVA et al., 1998).

O fragmento VP8 determina os P tipos específicos de Rotavírus A (LARRALDE et al., 1991; LARRALDE e GORZIGLIA, 1992), o fragmento VP5 é responsável por parte da reatividade cruzada entre as estirpes virais de diferentes sorotipos (LARRALDE et al., 1991). Estudos indicam que o fragmento VP5 apresenta variações nas sequencias nucleotídicas, enquanto que fragmento VP8 apresenta regiões mais conservadas (ESTES e COHEN, 1989).

A camada externa do vírus é extremamente lábil, sendo sua estabilidade dependente de cálcio. Desta forma, para manter a integridade e infectividade da partícula viral é necessária à presença de íons cálcio. Por outro lado, a estrutura da espícula é estabilizada através da clivagem da VP4 por agentes proteolíticos, e sofre alterações irreversíveis de conformação na presença de pHs altos (MUNFORD, 2007).

Ainda na camada externa ou capsídeo externo do Rotavírus, são encontradas 60 espículas compostas de dímeros de VP4, distribuídas sobre sua superfície. Estas espículas estão localizadas nas bordas dos canais nas regiões do eixo do pentâmero (PRASAD et al., 1990; FAUQUET et al., 2007).

Até o momento, foram identificados 31 genótipos e 15 sorotipos P, em que 11 foram detectados em humanos (ESTES e KAPIKIAN, 2007 ABE et al., 2009;).

1.5.3 Proteína de capsídeo intermediário - VP6

O capsídeo intermediário do Rotavírus é composto de 780 moléculas de VP6. Essa proteína é codificada pelo 6º segmento do genoma viral e é dita como proteína abundante do vírus, sendo considerada como o maior componente proteico estrutural do vírion já que representa mais de 50% da massa viral (ESTES & KAPNIKIAN 2007).

A VP6 está presente no capsídeo estrutural do vírus que é formado por 780 cadeias polipeptídicas distribuídas em 260 trímeros de aminoácidos. A trimerização é formada espontaneamente, sendo extremamente estável e mantendo assim sua conformação independente da presença de outras proteínas (CHARPILLENNE et al, 2002; GREIG et al, 2006). A estrutura do trímero VP6 consiste em, uma molécula do tipo torre com o seu eixo de tríplexes moleculares ao longo da sua dimensão de comprimento onde a base da torre fica em contatos com a camada interna, que é perpendicular ao eixo triplo molecular, essa camada interna é uma fina camada composta pela proteína VP2 que interage com VP6 através das superfícies, estudos indicam que os trímeros são a força motriz para a interação de VP6 e VP2 (CHARPILLENNE et al, 2002).

Referente à função, a proteína exerce papel estrutural importante por apresentar dois domínios distintos, um proximal de hélice α (domínio B) e outra distal de folha- β (domínio H), os quais permitem sua interação com os domínios do core (VP2) e ambas as proteínas do capsídeo externo (VP4 e VP7) (MATHIEU et al, 2001, CHARPLIENNI et al, 2002).

Essas interações fazem ainda com que a VP6 participe da organização do vírion, atuando como um intermediário físico entre duas funções biológicas distintas, sendo a primeira a entrada do vírus na célula hospedeira (capsídeo externo), e a segunda o empacotamento do RNA genômico viral (capsídeo interno) (ESTES e KAPIKIAN 2007).

Outra característica de importância epidemiológica da proteína VP6 é que ela não só especifica os antígenos de grupo (A-G), mais também possui variação antigênica para os Rotavírus do Grupo A que permite a classificação dos subgrupos (SGs), os quais são denominados SG I, SG II, SG I + SGII, SG não I, SG não II (ESTES e KAPIKIAN 2007).

Experimentos realizados em animais de laboratório, com a VP6, tem demonstrado potencial imunogênico dessa proteína, visto que seus domínios conservados podem funcionar como alvos para anticorpos heterotípicos homotípicos e conferir imunidade protetora (FENG et al., 2002, CORTHÉSY et al., 2006., WEI et al., 2006).

Devido presença de epítomos conservados e alta imunogenicidade em VP6, esse antígeno tem sido frequentemente escolhido para ensaios diagnósticos (HESTES E COHEN 1989, MASCARENHAS 2006).

1.6 DIAGNÓSTICO ROTAVÍRUS – PATENTES E PRODUTOS

De acordo com o Portal do Instituto Nacional de Propriedade Intelectual (INPI) – Patente é um título de propriedade temporária com validade entre 15 a 20 anos, que garante ao titular exclusividade ao explorar comercialmente a sua criação.

Em busca no banco de dados do INPI foram encontrados vinte e um processos que atendem a palavra-chave “Rotavírus” três desses achados relacionam-se ao uso e produção das proteínas recombinantes VP4 e VP6 (alvos de nosso estudo). Referente à VP4 foi encontrado a reivindicação - PI0317879-0 que trata a respeito da sua utilização para adesão celular, esta foi depositada em 2003 e atualmente encontra-se arquivada. Quanto a VP6 três processos foram encontrados – BR 11 2013009164 9 - PI1006641-1 e PI0815763-4, o primeiro trata-se do uso da proteína VP6 de Rotavírus para combinação de vacina, depósito realizado em 2011, a solicitação é ativa no momento. O segundo e o terceiro são do mesmo grupo relacionam-se ao uso de anticorpos anti-VP6 de Camelídeo para detecção, prevenção e tratamento de Rotavírus, depósito foi realizado em 2008 a solicitação ainda é ativa. Nas buscas realizadas, não foram encontrados depósitos de patentes que reivindique a comercialização dos moldes para obtenção dos produtos desenvolvidos em nosso estudo, o que favorece a aplicação do uso das ferramentas obtidas.

Em uma segunda busca, analisamos dados a respeito de produtos voltados ao diagnóstico rápido de Rotavírus, com vendas no Brasil, foram encontrados onze produtos disponíveis no mercado. Dentre esses, oito são do tipo ELISA e todos os kits encontrados são importados, o que dificulta sua utilização em centros Hospitalares de ordem pública, postos de saúde, bem como por laboratórios que atendem pelo Sistema único de Saúde (SUS), visto que para colocá-los à disposição dos usuários do SUS,

acarretaria gastos onerosos. Entretanto, a identificação rápida e eficaz de Rotavírus faz-se necessária, para que tratamentos adequados a essa virose sejam ministrados com presteza, evitando complicações que o quadro diarreico possa acarretar para a pessoa infectada, contribuindo, para diminuição significativa referente a gastos desnecessários com internações, e obtendo recuperação do paciente sem submetê-lo a exposição de antibióticos inúteis ao tratamento. O monitoramento dos episódios diarreicos na população é de extrema importância, não só para a verificação dos patógenos circulantes, emergentes ou re-emergentes, mais também como ferramenta de controle da eficiência das vacinas ministradas na população.

O bom diagnóstico e o controle epidemiológico constante, são os passos primordiais para o processo de contenção ou erradicação de qualquer doença de caráter infeccioso. De acordo com exposto, esse estudo tem como base contribuir com a redução dos custos de rotina e pesquisa para diagnóstico de Rotavírus, através do desenvolvimento de insumos de origem nacional.

OBJETIVOS

2. OBJETIVO GERAL:

Desenvolver ferramentas de detecção das proteínas VP4 e VP6 para imunodiagnósticos de Rotavírus do tipo A.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- ✓ Produzir as proteínas recombinantes VP4 e VP6 de Rotavírus A;
- ✓ Obter anticorpos policlonais em coelho e camundongos;
- ✓ Avaliar através de ensaios imunoenzimáticos anticorpos policlonais produzidos em cobaias imunizadas a partir da expressão das proteínas recombinantes – VP4 e VP6 a fim de avaliar a sua utilização no diagnóstico de Rotavírus do tipo A.

METODOLOGIA

3. METODOLOGIA

3.1 DESCRIÇÃO DO ESTUDO

Visando a obtenção de ferramentas úteis para estudos com Rotavírus, nessa pesquisa foram produzidas duas proteínas recombinantes. Esse desenho foi dividido em duas etapas, na primeira, uma proteína recombinante que estruturalmente compõe o capsídeo externo do Rotavírus – VP4 foi produzida, a partir da elaboração dessa ferramenta, coelho e camundongos foram imunizados com objetivo de conseguir anticorpos policlonais anti-VP4, capazes de reconhecer amostra recombinante e amostra nativa. Na segunda etapa, em busca de aperfeiçoar os resultados, optou-se expressar e purificar uma proteína produzida a partir de um gene sintético, desenhado com intuito de selecionar epítomos com maior probabilidade de serem reconhecidos por anticorpos.

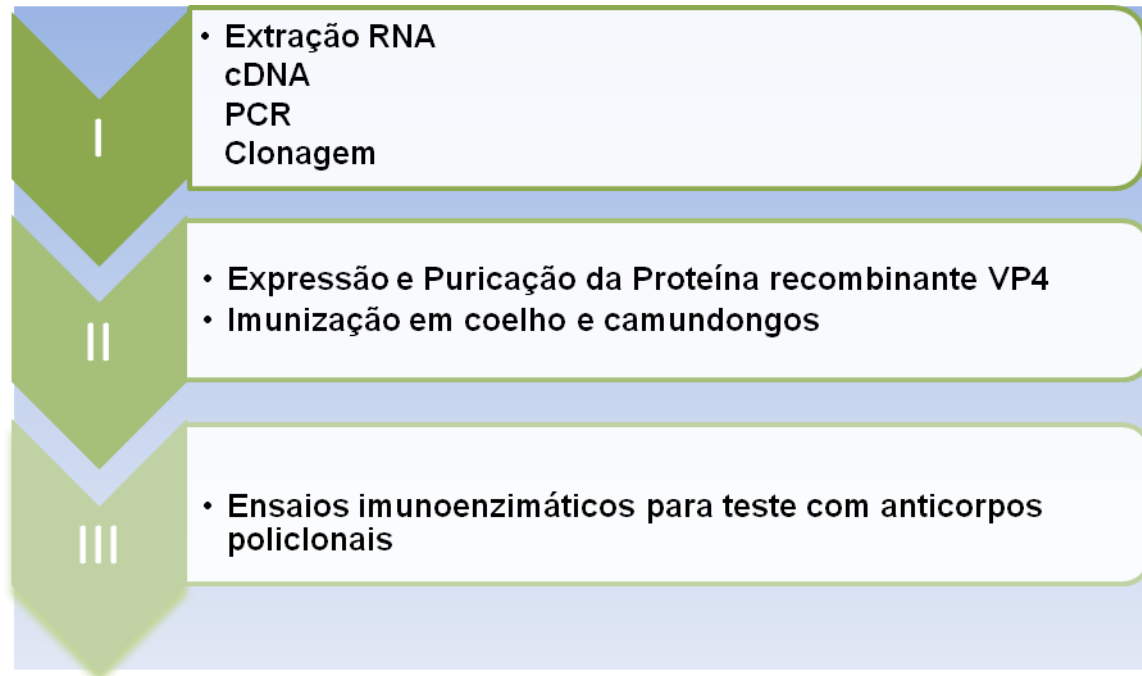
Dessa vez, com base na literatura, foi escolhida uma proteína mais conservada – VP6. Essa proteína estruturalmente permeia o capsídeo intermediário do Rotavírus. Assim como VP4, o VP6 também foi utilizado para imunização em coelho e camundongos.

3.2 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

Esse estudo foi submetido e aprovado junto ao Comitê de Ética Animal. Protocolo número (036-2013 CEEA-UFAM), (anexo 1).

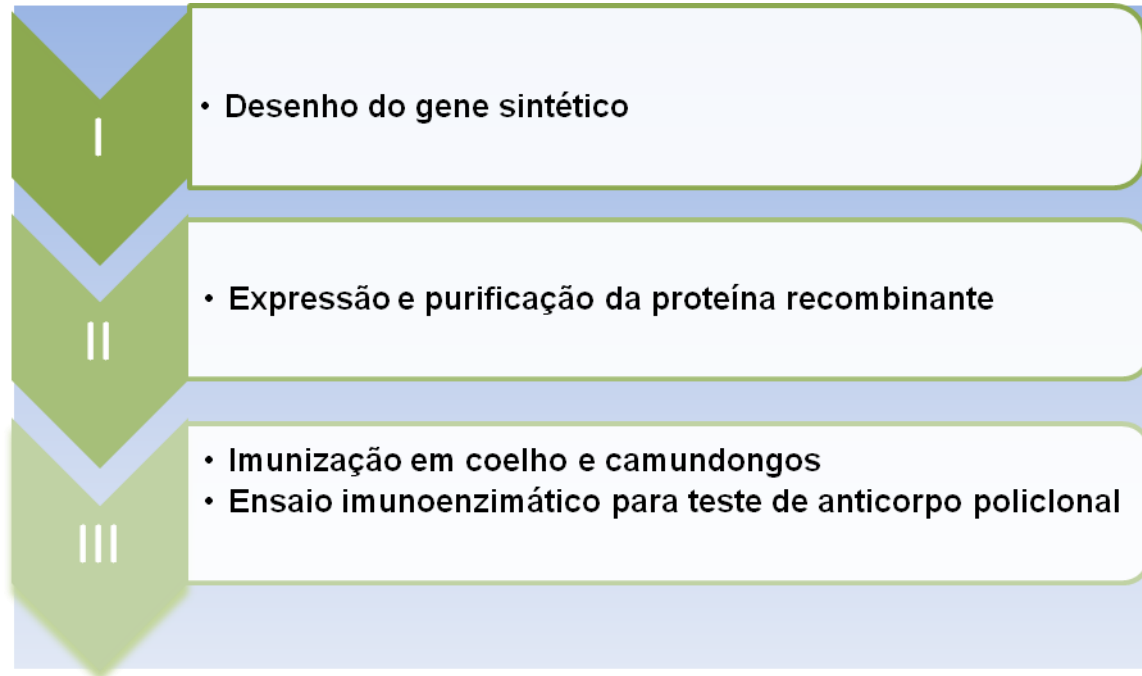
3.3 ETAPAS PARA DESENVOLVIMENTO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE VP4 E DE ANTICORPOS POLICLONAIS ANTI-VP4

3.3.1 Organograma:



3.4 ETAPAS PARA O DESENVOLVIMENTO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE VP6 E DOS ANTICORPOS POLICLONAIS ANTI VP6

3.4.1 Organograma:



3.5 ETAPAS PARA CLONAGEM DE VP4:

3.5.1 Cepa Padrão

Utilizou-se a cepa padrão WA de Rotavírus humano para a produção da proteína recombinante VP4. Para a extração do RNA genômico, utilizou-se uma alíquota da cepa cultivada em ensaios celulares.

3.5.2 Cultivo Celular MA₁₀₄ e Infecção por Rotavírus - WA

Foi utilizada cepa de células da linhagem MA₁₀₄, originárias de rim fetal de macaco *Rhesus* (ATCC CRL 2378.1), cultivadas em monocamada com *Meio Eagle Modificado por Dulbecco* (DMEM) contendo Soro Fetal Bovino. A cultura de célula foi mantida, por meio de sucessivos repiques, em estufa de CO₂ A 37°C. Para infecção celular um meio especial foi preparado – DMEM acrescido de 10 µg de tripsina.

Primeiramente as garrafas contendo monocamada da linhagem celular MA₁₀₄ foram separadas para o procedimento. Em fluxo laminar essas garrafas foram lavadas, cuidadosamente, com *Phosphate-Buffer Saline* (PBS 1X) por três vezes consecutivas. Paralelamente, uma linhagem de vírus ATCC WA foi ativada, utilizando a mesma

concentração de tripsina usada para o preparo do meio especial, para esse procedimento, foi empregado um microtubo, contendo tripsina mais WA e foi deixado em repouso a 37°C por 40 minutos. Após a lavagem das garrafas, ao tapete celular foi inoculado 100µl do meio especial. As garrafas já inoculadas foram deixadas em repouso durante 1 hora a 37°C para que houvesse adsorção do vírus às células. Após a adsorção, completou-se o volume das garrafas com mais meio especial. Esse volume variou de acordo com tamanho da garrafa utilizada. Utilizou-se garrafas para cultivo celular, tamanho médio padrão e o volume final foi completado para 1 ml. Uma garrafa contendo a monocamada celular foi usada apenas como controle do processo, nessa garrafa o vírus não foi utilizado.

3.5.3 Extração do RNA Genômico

A extração do RNA viral nesse estudo, foi realizada pelo método TRIzol, de acordo com o protocolo do fabricante Invitrogen. Este método é baseado na utilização de solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina. Em um microtubo de 1,5 ml homogeneizou-se em *vortex* 300µL da suspensão fecal com 750µL do reagente TRIzol®, e incubou-se por 5 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se 200µL de clorofórmio e novamente homogeneizou-se em *vortex* seguido de centrifugação a 14.000 rotações por minuto (rpm), temperatura em 4° C por 15 minutos. Transferiu-se o sobrenadante para outro tubo de 1,5 ml, sem retirar a interface, e o RNA foi precipitado com 500µL de isopropanol e 30µL da solução acetato de sódio a 0,3M, pH 5,0. Após, uma nova centrifugação a 12.000 rpm, 4°C por 10 minutos foi feita. Desprezou-se o sobrenadante. Ao ser precipitado, adicionou-se 500µL de etanol a 75% gelado e a amostra foi centrifugada por mais 5 minutos a 12.00 rpm, 4°C. Removeu-se o etanol com cuidado e o tubo foi invertido em papel absorvente por aproximadamente 20 minutos à temperatura ambiente para eliminar resquícios do etanol. Por fim ressuspendeu-se o RNA em 30µL de água DNase/RNase free e estocou-se à -20°C.

3.5.4 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (PAGE)

Pelo PAGE foi determinada a presença do RNA viral, bem como os eletroferotipos de Rotavírus, segundo o procedimento descrito por Pereira e colaboradores (1983). A coloração do gel foi feita através do método de impregnação de nitrato de prata, de acordo com a descrição de Herring e colaboradores (1982).

3.5.5 Gene alvo e iniciadores

Para as etapas de RT-PCR foram utilizados os iniciadores consensuais desenvolvidos por Gentsch e colaboradores (1992) 4con2/4con3 (P) – para amplificação do gene VP4. As sequências utilizadas foram:

- ✓ 4 Con3: 5' TGG CTT CGC CAT TTT ATA GAC A 3'
- ✓ 4 Con2: 3' ATT TCG GAC CAT TTA TAA CC 5'

3.5.6 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) precedida de transcrição reversa RT-PCR, para o genótipo P de Rotavírus

Inicialmente, realizou-se uma desnaturação seguida de rápido esfriamento para abrir e manter a fita dupla de RNA. Para cDNA usou-se 5 µl do RNA viral mais 0,25µl do primer - con2 - esse *mix* foi aquecido em 95°C a 5 minutos e rapidamente esfriado em 0°C por 5 minutos. Em seguida, adicionou-se ao microtubo 2,5 µl de DNTP, 2,5µl de tampão 10x, 1 µl de Mgl2 , 0,2 µl de RT Superscript II e água suficiente para 25 µl finais, o tubo foi incubado à temperatura de 42°C por 1 hora. Para etapa de PCR foram utilizados seguintes reagentes: tampão 10 x: 2,5 µl, DNTP 2,5 µl, Taq 0,2 µl e água suficiente para 25 µl volume final. Ao *mix* da PCR foi adicionado o volume de cDNA pronto e a reação foi submetida ao ciclo: de 94°C por 5 minutos, 40 ciclos posteriores de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 50°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos, e um ciclo de extensão final de 72°C por 10 minutos, mantendo, por fim, a temperatura de 4° C.

3.5.7 Eletroforese em gel de agarose e purificação de DNA

O produto da PCR foi submetido à eletroforese em Gel, de agarose na concentração de 1.5% em solução aquosa (Tris-Borato-EDTA) TBE 1X a 100 V. Posteriormente, o gel foi corado com brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta (UV).

A purificação de bandas de DNA após a eletroforese foi realizada através do kit *Gel Extraction Kit* (250) Qiaquick® (QIAGEN), conforme o protocolo fornecido pelo fabricante.

3.6 CLONAGEM

As cepas bacterianas da linhagem *Escherichia coli* e os plasmídeos de clonagem utilizados neste estudo para a produção de proteínas recombinantes encontram-se exibidos no quadro abaixo.

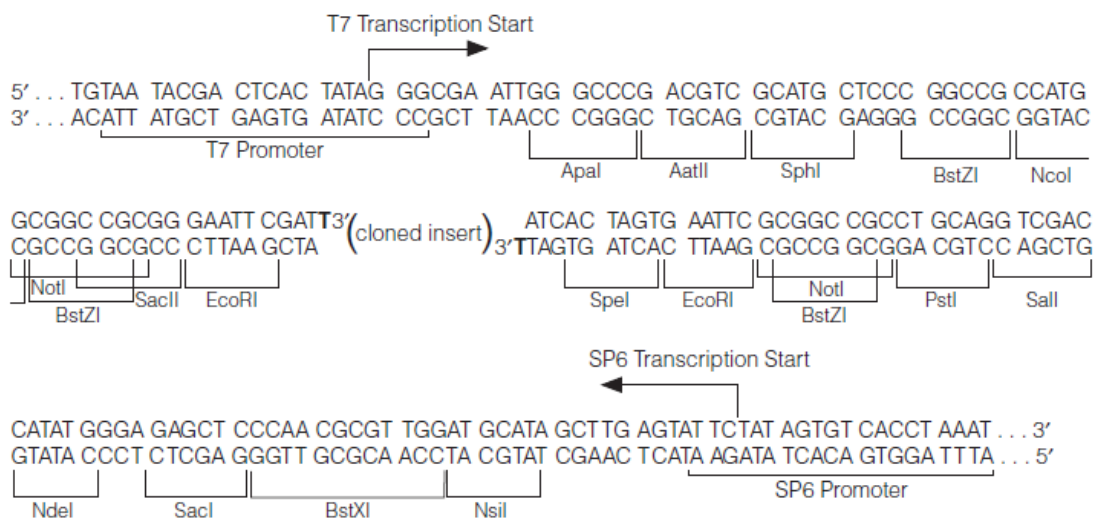
Quadro I. Cepas Bacterianas e Plasmídeos utilizados para a Clonagem de VP4 Rotavírus.

CEPAS BACTERIANAS	CARACTERÍSTICAS	FABRICANTE
TOP 10	<i>E. coli</i> quimicamente competente	Invitrogen
PLASMÍDEOS	CARACTERÍSTICAS	FABRICANTE
pGEM	Vetor de clonagem	Promega

3.6.1 Ligação ao vetor de clonagem

O fragmento purificado – VP4 - foi ligado ao vetor de clonagem pGEM T Easy, em uma reação que seguiu o método proposto pelo fabricante.

3.6.2 Plasmídeo de clonagem: *pGEM[®]-T Easy Vector*



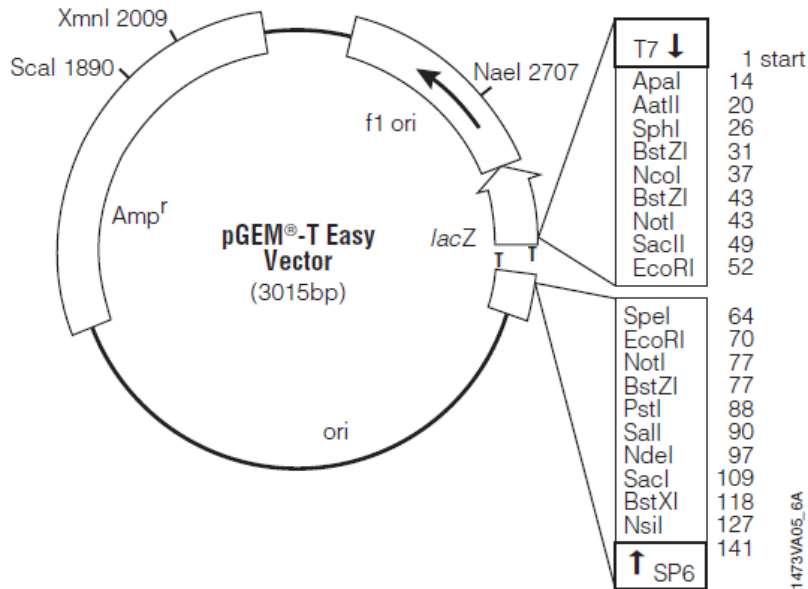


Figura 2: Sequência e mapa do plasmídeo de clonagem pGEM. Características do vetor de clonagem *pGEM-T Easy* (Promega) 3015 pares de bases. Sítio de iniciação da transcrição T7 RNA polimerase: base 1. Região múltipla de clonagem: bases 10-128. Promotor SP6 RNA polimerase (-17 a + 3): bases 139-158. Sítio de ligação do oligo Puc/M13 Reverse: 176-197. Códon iniciador *lacZ*: base 180. Operador *lac*: bases 200-216. Região Codificadora: lactamase (resistência à ampicilina): bases 1331-2197. Região fago f1: 2380-2835. Sequências do *lac operon*: bases 2836-2996, 166-395. Sítio de ligação do oligo Puc/M13 *forward*: bases 2949-2972. Promotor T7 RNA polimerase (-17 a +3): 2999-3.

Fonte: Manual Técnico Promega – 12/10

3.6.3 Preparação de célula competente para a inserção do plasmídeo recombinante

- transformação em Top 10

Antes da realização da transformação, foi preparada a célula quimicamente competente de *E. coli* TOP 10. Utilizou-se o protocolo fornecido pelo grupo de Pesquisa em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas-UFAM. Colônias de bactérias foram incubadas em 300 ml de LB líquido até atingir D.O 0.8 e, posteriormente, centrifugadas a 4.000 rpm, por 10 minutos, a 4 °C e a massa celular foi ressuspensa sucessivas vezes em tampão glicerol 10%. Em seguida foi colocado em microtubo para armazenar a -80°C.

3.6.4 Transformação e seleção de colônias

Do produto resultante da ligação (fragmento da VP4+ pGEM) foi retirado 1µl e colocado em microtubo contendo 50µl de bactérias competentes da espécie *Escherichia coli*, linhagem TOP 10, em seguida incubada por cinco minutos em gelo.

Posteriormente, colocou-se o conteúdo em cubeta de eletroporação para choque térmico a 1.900 V. Adicionou-se ao conteúdo 950 µl de LB+ (glicose 0,4% e MgCl₂ 20 mM final) e foram submetidas a crescimento por 1 hora a 37°C sob agitação constante. Após o crescimento, as bactérias transformadas foram semeadas em placas de Petri com meio LB-ágar contendo 100µg/mL de ampicilina, 25 µg/mL de *X-Gal* e 100 µg/mL de IPTG. Logo, as placas foram incubadas a 37°C por um período de 12 horas. As colônias transformantes foram submetidas a uma digestão, utilizando a enzima de restrição *EcoRI* seguindo o protocolo proposto pelo fabricante da enzima, para confirmação da presença do fragmento clonado. Aquelas que apresentaram resultado positivo foram submetidas a uma extração plasmidial utilizando o Kit de extração plasmidial *Mini-prep* da empresa QIAGEN, sendo seu protocolo fornecido pelo fabricante. Os plasmídeos obtidos foram em seguida sequenciados.

3.7 SEQUENCIAMENTO:

Para o conhecimento da sequência de bases nitrogenadas correspondente ao gene em questão, realizou-se o sequenciamento das amostras (plasmídeo com o inserto das respectivas proteínas) em parceria com as Plataformas de Sequenciamento da Fundação Oswaldo Cruz / BA e Fundação Oswaldo Cruz / AM. Para esta reação, utilizou-se o oligonucleotídeo universal T7. Posteriormente, realizou-se a análise do sequenciamento por Bioinformática utilizando as ferramentas disponíveis *online* BLASTp (*NCBI*) e Protparam (*Expasy*).

3.8 PRODUÇÃO DA VP6

3.8.1 Desenho do Gene Sintético

Para o desenho do gene sintético, utilizou-se as informações referente à proteína VP6, descrita no estudo de Dina Schneidman-Duhovny e colaboradores (2003) e Brett A McKinney e colaboradores (2007) que mostraram em forma tridimensional a posição da proteína (conformação espacial), bem como dos epítomos mais aparentes. Com as informações obtidas, dados encontrados no *Protein Data Bank* (PDB) que proporciona avaliar de forma clara as regiões mais expostas do antígeno da proteína foram utilizados.

A partir das análises *in silico* e de referência na literatura (DINA SCHNEIDMAN-DUHOVNY et al., 2003, MATHIEU M, PETITPAS 2001 e BRETT A MCKINNEY et al.,2007) da proteína VP6, foram selecionados epítomos com maiores

chances de serem reconhecidos por anticorpos. Com isso, três sequências foram selecionadas, são elas: 169-176aa **SQPAHDNL** - 196-204aa **SCAINAPAN** - 296-316a **RPPNMTPAVAALFPNAQPFEH**. Como pode ser observado na figura 3.

Partindo das sequências dos epítomos descritos acima, foi desenhado um gene sintético com viés de códon próprio para expressão em *Escherichia coli*. Entre cada epítomo foram inseridos sítios de restrição. Estas informações foram enviadas ao fabricante de genes sintéticos (*IDT - Integrated DNA Technologies*) para síntese (figura 4). A Análise de bioinformática para identificar a massa molecular esperada de cada proteína foi realizada no programa Protparam.

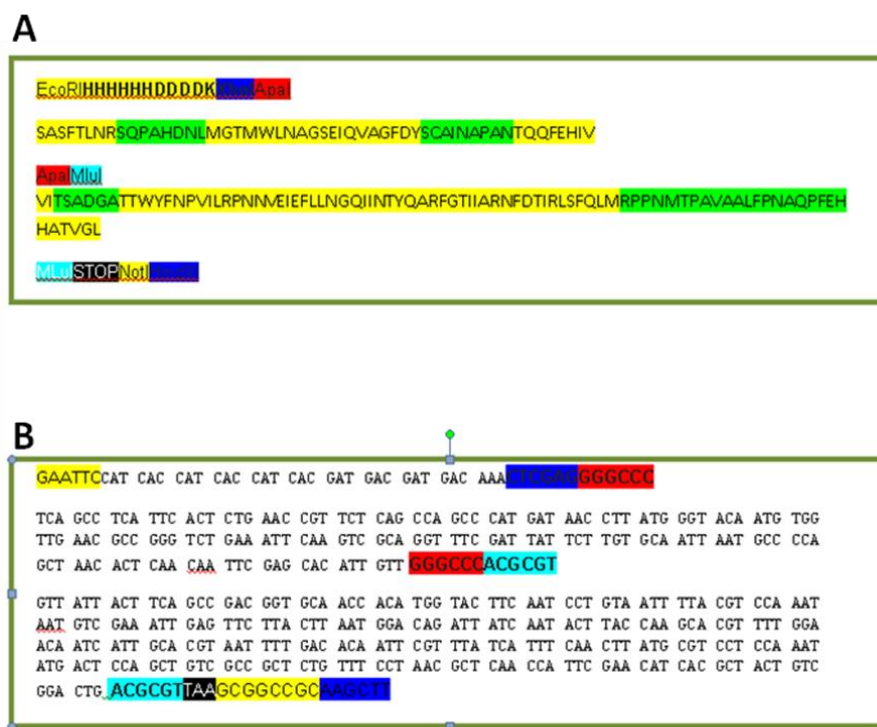


Figura 3: Desenho do gene sintético. A: a sequência do gene sintético VP6 em aminoácido, com as enzimas de restrição utilizadas *XhoI* e *HindIII* em destaque (azul) e em verde os possíveis epítomos de ligação de células B. **B:** a sequência do gene sintético VP6 em nucleotídeos.

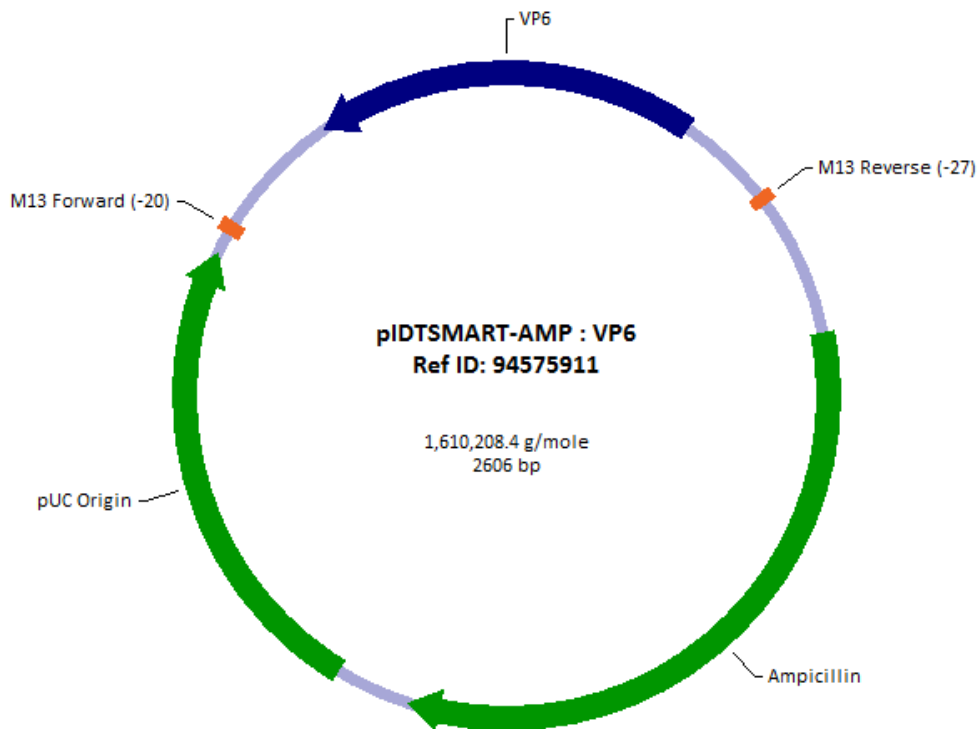


Figura 4: Gene VP6-pSMART. Esquema do gene VP6 em plasmídeo de clonagem pSMART enviado pelo fabricante IDT. **Fonte:** IDT - *Integrated DNA Technologies*

3.9. SUBCLONAGEM PGEM-VP4 E PSMART-VP6 EM VETOR DE EXPRESSÃO PRSET

3.9.1 Digestão com enzimas de restrição do pGEM-Vp4

Após confirmação por sequenciamento do pGEM-Vp4, o plasmídeo com inserto foi digerido, juntamente com o vetor de expressão pRSETB, utilizando a enzima de restrição *EcoRI* de acordo com o protocolo proposto pelo fabricante. Posteriormente, o produto foi submetido à eletroforese em tampão TBE 1X a 100 V, utilizando agarose na concentração 1.5%, para a verificação das respectivas bandas. Subsequentemente, os fragmentos liberados e o pRSETB linearizado foram purificados pelo o Kit *QIAquick Gel extraction* da empresa QIAGEN, de acordo com manual do fabricante. Os fragmentos purificados VP4 foram ligados pela enzima T4 ligase ao vetor de expressão pRSETB em uma proporção 3:1 respectivamente, em seguida a reação foi incubada a 16°C *over night*.

3.9.2. Digestão com enzimas de restrição do pSMART-Vp6

O gene sintético produzido pelo fornecedor *IDT Integrated DNA Technologies* em plasmídeo de clonagem pSMART, foi digerido com a finalidade de inseri-lo em vetor de clonagem pRSETA.

Para o procedimento, utilizou-se 1 µl das enzimas de restrição *XhoI* e *HindIII* (*Invitrogen*), 4 µl do vetor de clonagem pSMART-VP6 e 1 µl pRSETA, 2 µl tampão das respectivas enzimas e completou-se com H₂O para um volume final de 20 µl, seguida de incubação a 37°C por 1 hora. Posteriormente, o produto foi submetido à eletroforese em tampão TBE 1X a 100 V, utilizando agarose na concentração 1.5%, para a verificação das respectivas bandas em gel. Em seguida as bandas obtidas da digestão foram purificadas, utilizando o *Kit Gel Extraction (250) Qiaquick® (QIAGEN®)*, conforme as instruções do fabricante. Por fim, o inserto VP6 foi ligado em pRSETA, em uma proporção 1:2 utilizando 2 µl da enzima T4 ligase, tampão da enzima 10X e acrescido de H₂O para volume final de 50µl.

3.10 CEPAS BACTERIANAS USADAS NA SUBCLONAGEM

As cepas Bacterianas da linhagem *Escherichia coli* e os plasmídeos de expressão utilizados para a produção de proteínas recombinantes encontram-se caracterizados no quadro abaixo.

Quadro II. Cepas Bacterianas e plasmídeos utilizados para Expressão de VP6 e VP4 RV.

CEPAS BACTERIANAS	CARACTERÍSTICAS	FABRICANTE
BL 21 (DE3) pLyss	<i>E. coli</i> quimicamente competente	Invitrogen
PLASMÍDEOS	CARACTERÍSTICAS	FABRICANTE
pRSETA	Vetor de expressão	
pRSETB	Vetor de expressão	Invitrogen

3.10.1 Plasmídeo de expressão pRSETA:

21 T7 promoter RBS
 AATACGACTC ACTATAGGGA GACCACAACG GTTCCCTCT AGAAATAATT TTGTTTAACT TTAAGAAGGA

91 Polyhistidine (6xHis) region
 GATATACAT **ATG** CGG GGT TCT CAT CAT CAT CAT CAT CAT GGT ATG GCT AGC ATG ACT
Met Arg Gly Ser His His His His His His Gly Met Ala Ser Met Thr

148 T7 gene 10 leader Xpress™ Epitope BamHI
 GGT GGA CAG CAA ATG GGT CGG GAT CTG TAC GAC GAT GAC GAT AAG GAT CGA TGG GGA
 Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Asp Leu Tyr Asp Asp Asp Asp Lys Asp Arg Trp Gly
EK recognition site Eκ cleavage site

205 XhoI SacI BglII PstI PvuII KpnI NcoI EcoRI BstBI HindIII
 TCC GAG CTC GAG ATC TGC AGC TGG TAC CAT GGA ATT CGA AGC TTG ATC CGG CTG CTA
 Ser Glu Leu Glu Ile Cys Ser Trp Tyr His Gly ile Arg Ser Leu Ile Arg Leu Leu

262 T7 reverse priming site
 ACA AAG CCC GAA AGG AAG CTG AGT TGG CTG CTG CCA CCG CTG AGC AAT AAC TAG CAT
 Thr Lys Pro Glu Arg Lys Leu Ser Trp Leu Leu Pro Pro Leu Ser Asn Asn *** His

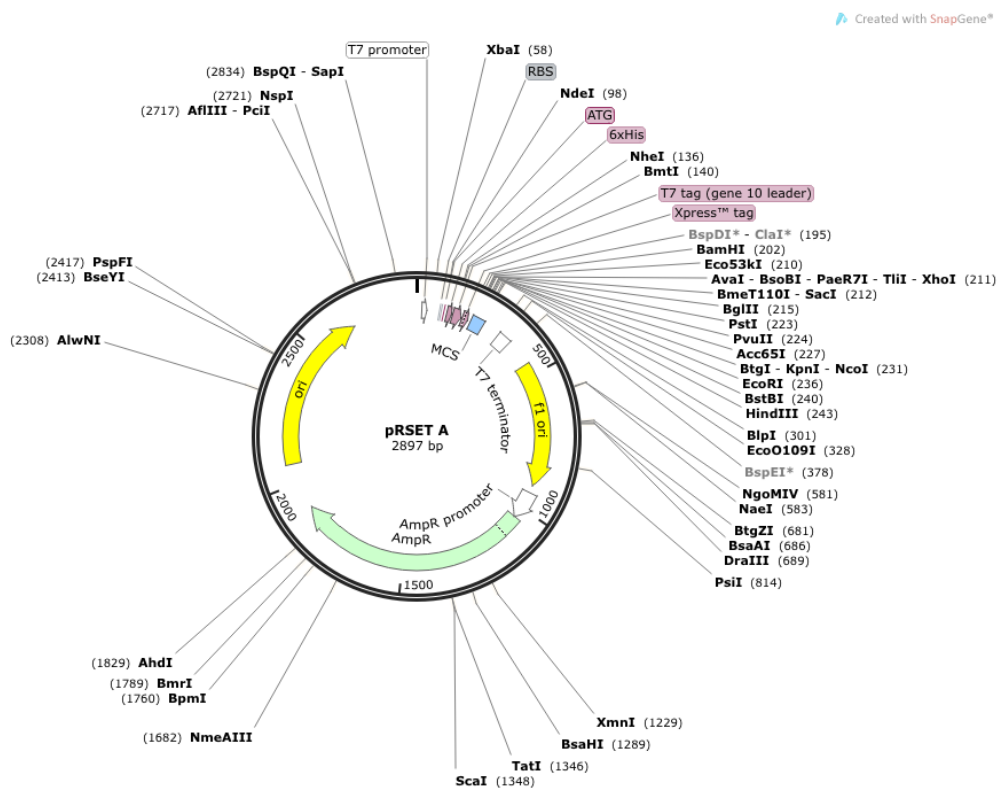


Figura 5: Sequência e mapa do plasmídeo de expressão pRSETA. Sendo este utilizado para subclonar a sequência do VP6. **Fonte:** Manual Técnico Invitrogen (Catálogo V 351-20).

3.10.2 Plasmídeo de expressão – pRSETB

```

21  T7 promoter
    AATACGACTC ACTATAGGGA GACCACAACG GTTTCCTCT AGAAATAATT TTGTTTAACT TTAAGAAGGA
                                     RBS

91  GATATACAT ATG CGG GGT TCT CAT CAT CAT CAT CAT CAT GGT ATG GCT AGC ATG ACT
    Met Arg Gly Ser His His His His His His Gly Met Ala Ser Met Thr

148 T7 gene 10 leader
    GGT GGA CAG CAA ATG GGT CGG GAT CTG TAC GAC GAT GAC GAT AAG GAT CCG AGC TCG
    Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Asp Leu Tyr Asp Asp Asp Asp Lys Asp Pro Ser Ser
                                     EK recognition site   EK cleavage site

    Xpress™ Epitope   BamHI   XhoI SacI

205 BglII   PstI   PvuII   KpnI   NcoI   EcoRI   BstBI   HindIII
    AGA TCT GCA GCT GGT ACC ATG GAA TTC GAA GCT TGA TCCGGCTGCT AACAAAGCCC
    Arg Ser Ala Ala Gly Thr Met Glu Phe Glu Ala ***

261 T7 reverse priming site
    GAAAGGAAGC TGAGTTGGCT GCTGCCACCG CTGAGCAATA ACTAGCATAA
    
```

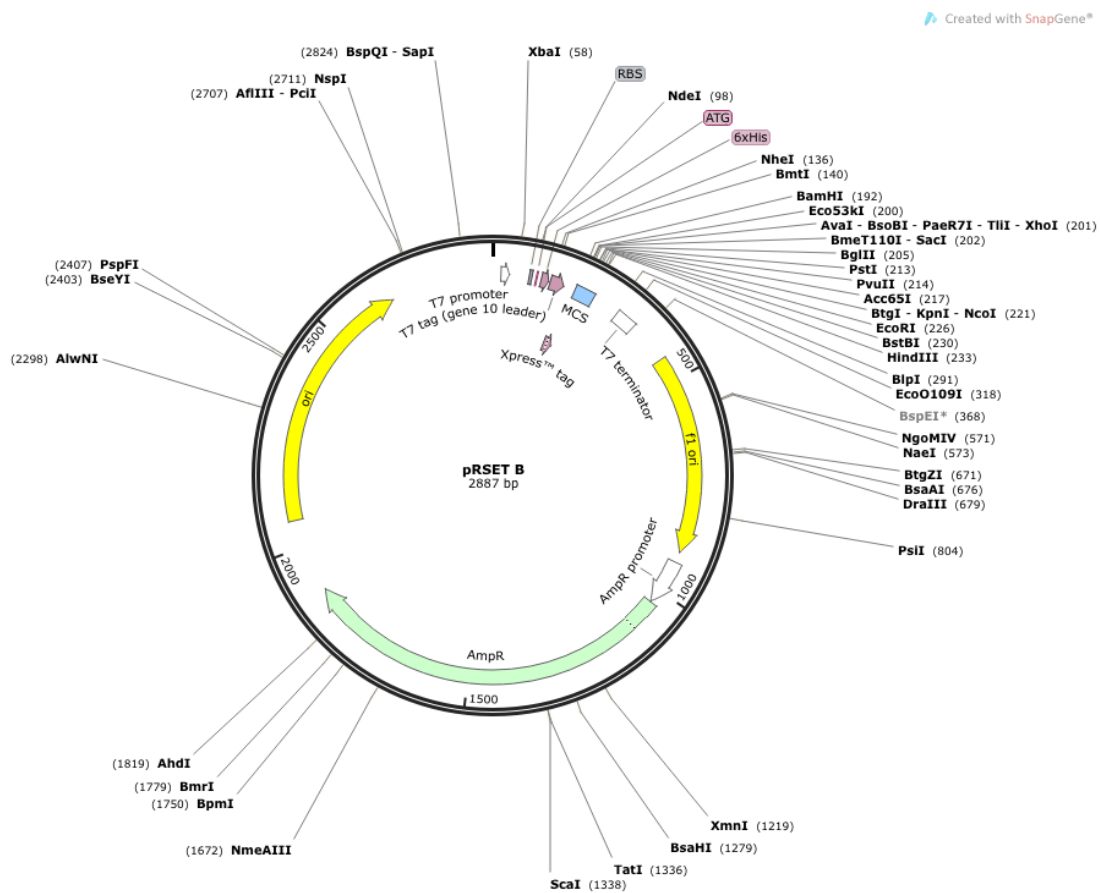


Figura 6: Sequência e mapa do plasmídeo de expressão pRSETB. Sendo este utilizado para subclonar a Vp4. Promotor T7: T7 Promotor: bases 20-39 c6xHis tag: 112-129. T7 gene 10 leader: bases 136-162 Xpress™ epitope: bases 169-192. Multiple Cloning Site: bases 202-248 T7 reverse primer Site: 295-314. T7 transcription terminator: bases 256-385 fl origin: bases 456-911 bla promoter: 943-1047 Ampicilin bla resistance gene (ORF): bases 1042 – 1902 pUC origin: bases 916-2852.

Fonte: Manual Técnico Invitrogen (Catálogo V 351-20).

3.10.3 Transformações e verificação do correto sentido de leitura

Os fragmentos VP4 e VP6 ligados aos vetores de expressão pRSETB e pRSETA respectivamente foram transformados em *Escherichia coli*, cepa Top 10. Nessa etapa seguiu-se o protocolo citado no **ítem 3.6.4**, porém, dessa vez para o preparo das placas usando meio LB ágar utilizou-se apenas ampicilina, na mesma concentração anterior. As colônias transformantes de VP4 e VP6 recombinante foram submetidas à extração plasmidial utilizando o Kit de extração *Miniprep* da empresa QIAGEN, sendo seu protocolo fornecido pelo fabricante. Os plasmídeos obtidos em seguida foram sequenciados esta etapa procedeu-se como descrito no **ítem 3.7** acima, e digeridos com suas respectivas enzimas para confirmação da presença do fragmento e VP4 e VP6.

Para essa etapa utilizamos o seguinte protocolo:

Digestão VP4:

Utilizamos a enzima: *EcoRI*, seguindo o protocolo proposto pelo fabricante da enzima. As colônias transformantes que apresentaram fragmentos, na altura 483 pb, foram submetidas a extração plasmidial e seus plasmídeos sequenciados.

Digestão VP6:

Utilizamos a enzima: *MluI*, seguindo o protocolo proposto pelo fabricante da enzima. As colônias transformantes que apresentaram fragmentos na altura 360 pb foram submetidas a extração plasmidial e seus plasmídeos foram sequenciados.

3.10.4 Transformação de Células Eletrocompetentes (*E. coli* BL21 (DE3) pLYSS)

Após a confirmação do inserto no plasmídeo de expressão, por digestão das colônias e sequenciamento, realizou-se a transformação com a inserção do plasmídeo em célula bacteriana competente *E. coli* BL21 (DE3) pLysS, seguindo mesmo método descrito no tópico **3.6.4**, porém desta vez com os respectivos antibióticos para o crescimento bacteriano em placas com ampicilina (100µg/mL) e cloranfenicol (34µg/mL). Por conseguinte, as colônias que apresentaram resistência a ampicilina e cloranfenicol foram selecionadas por possuírem o plasmídeo com inserto e transformadas.

3.10.5 Cultivo e indução das proteínas VP4 e VP6 recombinantes

As colônias transformadas foram cultivadas em 3 ml de LB contendo os seguintes antibióticos, ampicilina (100µl/mL) e cloranfenicol (34µl/mL) por 16 horas a 37 °C sob agitação constante.

Após o crescimento das colônias, foram adicionados 1,5 ml deste pré-inóculo em 500 ml de meio LB contendo os respectivos antibióticos. Posteriormente, o conteúdo foi incubado a 37°C sob agitação constante até atingir uma absorbância de $A_{600} = 0.6$ D.O. A esse crescimento foi adicionado reagente indutor *isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside* (IPTG) na concentração final de 1mM. O conteúdo foi incubado a 37°C sob agitação constante, por três horas e centrifugado a 4.000 rpm, por 15 minutos, a 4°C.

3.11 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS EM GEL SDS - PAGE

Para a análise da expressão das proteínas recombinantes (VP4 e VP6), utilizou-se a técnica de eletroforese em gel poliacrilamida-SDS-PAGE 15% SDS (*running gel*) e 5% (*stacking gel*), na presença da solução acrilamida/bisacrilamida 30%, Tris 1M pH 8,8, persulfato de amônia a 10% (APS); *dodecil sulfato de sódio* (SDS) 10% e 6µl de Temed e água miliQ para um volume final de 15ml seguindo Sambrook e colaboradores (1989). As proteínas foram aplicadas no gel com tampão de corrida (Tris 0,01M, Ph 6,8; SDS 10%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,06% e DTT a 4%) e em seguida desnaturadas por aquecimento á 95°C por 10 minutos. A eletroforese foi realizada sob constante tensão de 100 V. Após corrida em gel de poliacrilamida, fixou-se a proteína em solução corante contendo azul de Coomassie (*coomassie blue* 0,2%), ácido acético glacial 7%, etanol 40%, diluídos em H₂O destilada, que além de fixá-las, mantém as proteínas desnaturadas.

Uma vez coradas, foram submetidas à descoloração, utilizando os mesmos reagentes citados acima, exceto o *Coomassie*, para visualização e análise de proteínas.

3.12 WESTERN BLOTS

A detecção da presença da cauda de polihistidina nos antígenos recombinantes foi realizada pela técnica de *Western blot* (TOWBIN et al.,1979). Para isso, as proteínas foram separadas por eletroforese SDS-PAGE 15% e transferidas por eletroforese para membrana de nitrocelulose, ambos embebidos em tampão 0,025 M Tris, 0,192 M glicina, pH 8,5, e metanol 20%. O sistema foi colocado em uma cuba específica para

eletrotransferência (*Semidry system*, Bio-rad, Hercules, USA) sendo submetido a uma voltagem constante de 12 V durante 50 minutos. Após ser retirada do sistema, a membrana foi mantida no mesmo tampão de transferência descrito, até o momento da revelação. Posteriormente, realizou-se a revelação utilizando kit comercial *Western breeze* (Invitrogen), seguindo as recomendações do fabricante.

3.13 PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Primeiramente, as proteínas recombinantes foram induzidas em uma condição piloto a 37°C contendo 1mM IPTG durante 3 horas. Posteriormente, a confirmação da indução foi feita por gel SDS-PAGE e revelação de *western blot* com um anticorpo monoclonal anti-histidina.

Para essa metodologia, utilizou-se uréia 8M e 2% β -mercaptoetanol visto que as proteínas se encontram na porção insolúvel. A purificação ocorreu através da técnica denominada Cromatografia de Afinidade com Metal Imobilizado (IMAC), desenvolvida por Porath em 1975. Neste estudo, utilizou-se a coluna de purificação contendo íons Ni²⁺ (Qiagen®) em afinidade a cauda de Histidina inserida na proteína. A retenção das proteínas VP4 e VP6 foram testadas em várias concentrações de imidazol, em duplicata. Para a realização da purificação das proteínas recombinantes, a cultura do induzido, foi centrifugada a 4000 rpm por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e a massa celular foi ressuspensa em tampão de lise contendo, 20 mM Tris pH 8.0, 500 mM NaCl, 1M de PMSF e glicerol a 10% 8M de ureia e 2% β -mercaptoetanol. Em seguida, foram submetidas ao processo de lise celular por sonicação. O produto da sonicação foi centrifugado por 15 min a 14000 rpm e o sobrenadante recuperado. A coluna de purificação contendo íons Ni²⁺ foi previamente lavada com H₂O e tampão de lise.

Posteriormente, foi adicionado o sobrenadante lisado, contendo a proteína (de 1 em 1 ml). Em seguida foram realizadas lavagem para verificar a retenção da proteína Vp4 e VP6 na coluna, seguindo as seguintes concentrações de Imidazol 20Mm; 40Mm; 60Mm; 80Mm. O tampão de eluição com imidazol foi adicionada sempre de duas vezes de 500 ul, nas seguintes concentrações: 200Mm, 300Mm, 400Mm e 500Mm de Imidazol sendo separadas em alíquota E1 e E2. Todas as alíquotas foram armazenadas a -20°C. O monitoramento deste processo foi realizado através de eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS-PAGE 15%, como descrito no **tópico 3.5.4**.

3.14 IMUNIZAÇÕES DE CAMUNDONGOS BALB/C E COELHO

Tanto o coelho quanto camundongos da linhagem Balb/C foram imunizados via peritônio com as proteínas purificadas 50µg somadas (volume/volume) com o adjuvante de *Freund* completo. Duas semanas depois da primeira inoculação foi realizado o reforço com a proteína mais o adjuvante de *Freund* incompleto (volume/volume). Dez dias depois, foi retirado o sangue dos animais imunizados através de um corte na calda e um ensaio por *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assays* – ELISA como proposto por Harlow e Lane (1988) foi feito para detectar a reatividade dos soros contra a proteína recombinante e proteína nativa do Rotavírus. Duas semanas depois de confirmada a reatividade por ELISA com a proteína, foi realizado o reforço final no animal.

3.15 VALIDAÇÃO DOS ANTICORPOS POLICLONAIS PRODUZIDOS, A PARTIR DA CONSTRUÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

3.15.1 *Western Blots*

Westerns blots foram realizados para detectar a presença do antígeno nativo em cepas de Rotavírus WA cultivadas em ensaio celular, para isso IgG anti-VP4 e anti-VP6 produzidos em coelho e camundongos foram utilizados. A amostra foi separada por eletroforese SDS-PAGE 15% e a transferência das bandas para o papel de nitrocelulose foi de acordo com o tópico 3.10. Para revelação foi utilizando kit comercial anti-mouse e anti-rabbit do *Western breeze* (Invitrogen®), seguindo as recomendações do fabricante.

3.16 CITOMETRIA DE FLUXO:

3.16.1 Marcação de células para leitura em citometria de fluxo:

Uma alíquota de 100 µl de *pellet* de células – MA₁₀₄ – infectadas foi utilizada para teste de marcação de IgG de coelho anti-VP6. Em seguida, lavou-se o *pellet* com PBS 1X + BSA 5% (albumina sérica bovina) – PBS-P-Wash. Ao precipitado, foi adicionado 2ml de PBS 1X + BSA 5% + SAPONINA 5% - PBS-P- por 10 minutos. Posteriormente, outra lavagem com PBS-Wash foi feita e adicionou-se anticorpo primário IgG de coelho anti-VP6. Incubou-se por 30 minutos a temperatura ambiente. Após o tempo de incubação o tubo foi lavado por 2x com *PBS-Wash*. O anticorpo

secundário anti-igG coelho conjugado a *Alexa Flour 488*, foi adicionado e a amostra foi incubada por mais 30 minutos. Seguiu-se outra etapa de lavagem com *PBS– Wash*, seguido de fixação com Paraformaldeído a 4% e leitura em citômetro de fluxo. O procedimento de Marcação celular ocorreu a partir do primeiro dia de infecção celular até o 6º dia. A cada dia de infecção, uma célula MA104 sadia, foi marcada para controle da reação. A análise da Citometria foi realizada através da parceria com a Plataforma de Desenvolvimento de Tecnologia e Insumos, junto a Plataforma de Citometria de Fluxo Fiocruz - AM. Para as análises de Citometria, foi utilizado o aparelho *FACSCanto*TM e o programa *Flow-Jo* versão 7.6.5.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 PRODUÇÃO DO ANTÍGENO RECOMBINANTE - VP4

4.1.2 Clonagem e subclonagem da proteína VP4

A PCR para o gene VP4 de Rotavírus da cepa padrão WA foi otimizada com os primers *4con3* e *4con2* (descritos no ítem 3.5.5) de Gentsch e colaboradores (1992), resultando em fragmento de tamanho esperado aproximado de 483 pb, (Figura 7A). A purificação do *amplicon* com o kit *Gel Extraction* da empresa QIAGEN, foi confirmada em gel de agarose 1,5% (Figure 7B), a qual foi visualizada em eletroforese em gel de agarose a 1,5% (Figura 7C).

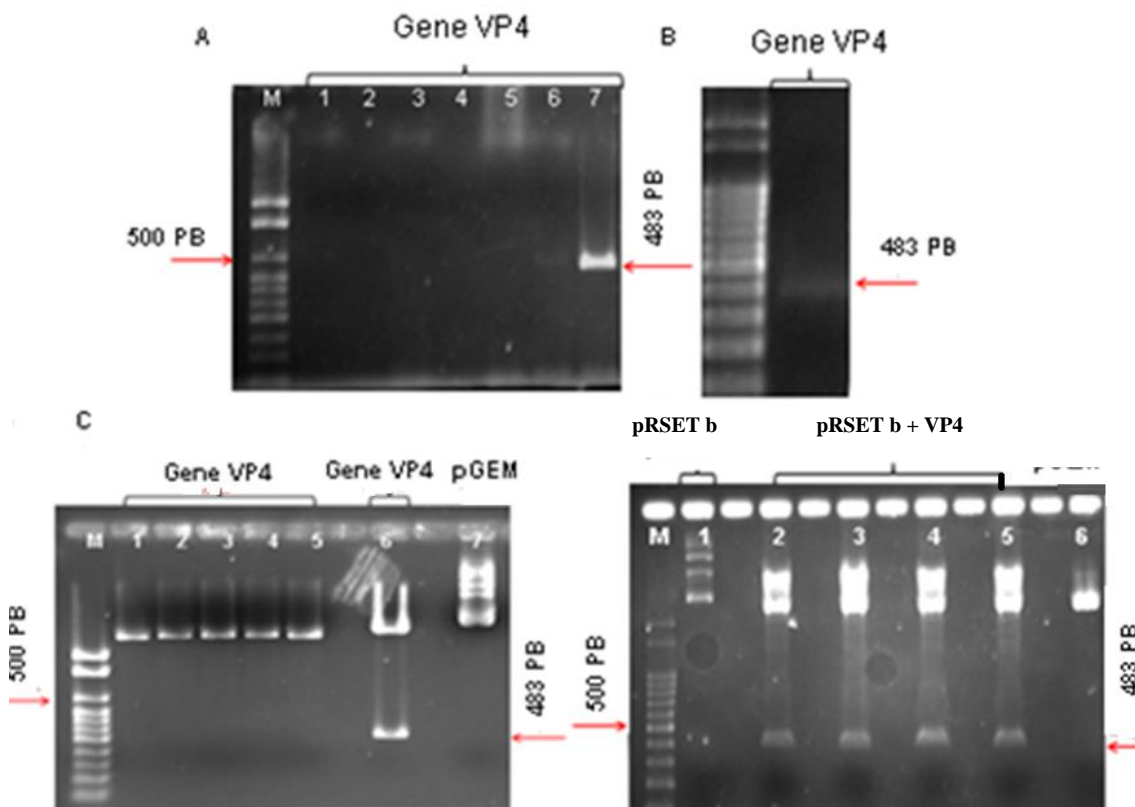


Figura 7: Etapas de clonagem e sub-clonagem de fragmento VP4. (A) Otimização da reação de PCR, usando iniciadores – *4con3* e *4con2* de Gentsch e colaboradores (2002), com alvo para o Gene VP4 utilizando a extração de RNA viral da cepa WA de Rotavírus. Nas canaletas 1-6 A, notamos que não houve amplificação do gene trabalhado, a canaleta 7 apresentou uma banda com tamanho 483 pb tamanho exato do *amplicon*. (B) Purificação com tamanho de fragmento 483 pb. (C) A figura mostra a digestão da extração plasmidial (*miniprep*) do gene VP4 e do plasmídeo pGEM. As canaletas de 1-5 não apresentaram o fragmento VP4, diferente da colônia 6 que mostrou um fragmento do tamanho 483 pb específico do gene VP4. A canaleta 7 mostra o plasmídeo pGEM digerido. (D) A figura acima mostra a digestão da extração plasmidial (*miniprep*) do gene VP4 e do plasmídeo pRSET B. A canaleta 1 refere-se ao plasmídeo pRSET B sem fragmento, as canaletas 2-5 apresentaram fragmento VP4, a canaleta 6 é um controle da digestão (pRSET sem enzima de restrição).

A confirmação de que o fragmento clonado se tratava da VP4 foi realizada por sequenciamento com a análise de similaridade com amostras depositadas no banco de sequência gênicas do *Nacional Center for Biotechnology Information NCBI* utilizando a ferramenta gênica “blast n“. A análise do sequenciamento demonstrou que a pGEM-VP4 recombinante, produzida nesse estudo, teve similaridade com VP4 de Rotavírus.

Após confirmação da clonagem da VP4, os plasmídeos pGEM-VP4 e vetor de expressão pRSETB foram digeridos com enzima *EcoRI*, em seguida ligados em pRSETB digerido, para introdução na célula hospedeira *E. coli* TOP 10. A confirmação da subclonagem foi realizada por digestão com *EcoRI*, onde observou-se que 4 plasmídeos de 5 digeridos apresentavam o inserto no tamanho esperado. (Figura 7D).

Novamente o sequenciamento foi realizado, a fim de avaliar a qualidade dos plasmídeos obtidos e a correta inserção dos fragmentos no vetor de expressão (pRSET-VP4). Observou similaridade com VP4 de Rotavírus já depositados em banco de dados.

4.1.3 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DO ANTÍGENO RECOMBINANTE VP4

A proteína VP4 - pRSETB foi expressa juntamente a uma cauda de polihistidina cultivando a *E. coli* BL21-DE₃ sob indução de IPTG por 3 horas. Essa se encontrava na porção insolúvel do lisado bacteriano. Após purificação a proteína apresentou tamanho esperado de 18 kDa (Figura 8A). A confirmação da expressão foi realizada por *western blot*, que reconheceu a cauda de polihistidina (Figura 8B).

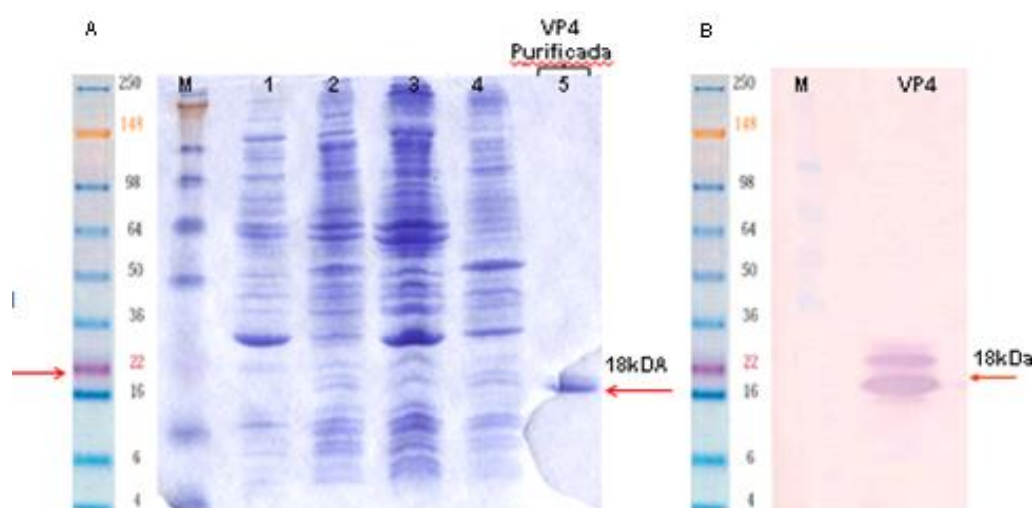


Figura 8: Expressão da proteína VP4. (A) Gel SDS PAGE, mostrando: Canaleta 1: Marcador de proteínas, Canaleta 2: *E.coli* – Bl 21 induzida 3 horas (sobrenadante), Canaleta 3: *E.coli* – Bl 21 induzida 3 horas *pellet*, Canaleta 4: VP4 induzida 3 horas (sobrenadante), Canaleta 5: VP4 induzida 3 horas (*pellet*) e Canaleta 6: VP4 purificada em coluna de níquel. (B) A figura mostra proteína purificada – VP4 recombinante. Revelação em *western Blot*. Tamanho do fragmento purificado 18 kDa.

4.2 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS ANTI-VP4

4.2.1 Anti-VP4 Coelho e Camundongos

Tendo em vista a produção de anticorpos policlonais, camundongos e coelho foram imunizados com a proteína recombinante purificada VP4. Realizou-se ELISA indireto para verificar a resposta de anticorpos às imunizações, utilizando soro de coelho diluído 1/100. A proteína foi bastante imunogênica pela boa resposta de anticorpos anti-VP4 de ambas as espécies de animais, coelho (figura 9A) e camundongos (figura 9B).

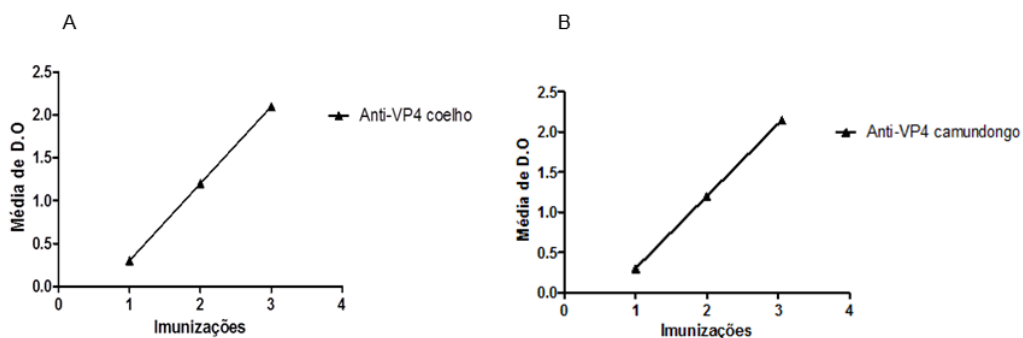


Figura 9: Imunogenicidade da proteína VP4. ELISA Indireto com os antissoros dos animais imunizados proteína recombinante VP4. Os valores de absorbância estão representados no eixo Y e as imunizações de coelho estão representadas no eixo X. **A)** resposta do coelho **B)** resposta camundongo.

4.3 PRODUÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE – VP6

Para a produção da proteína recombinante VP6, uma sequência de DNA a partir de domínios imunogênicos do gene VP6 de Rotavírus foi desenhado e a sequência foi sintetizada e clonada em plasmídeo pSMART, diretamente pelo fornecedor *IDT - Integrated DNA Technologies*.

4.3.1 Subclonagem do gene VP6 – pRSETA

O plasmídeo de clonagem VP6-pSMART e plasmídeo de expressão pRSETA vazio foram digeridos com as enzimas de restrição *XhoI* e *HindIII* e o fragmento liberado de 460 pb foi purificado, em seguida ligado no vetor pRSETA, e inserido na célula hospedeira da linhagem *E. coli* TOP 10 por transformação (figura 10A). Após transformação pRSETA mais VP6, uma extração plasmidial das colônias transformantes foi realizada, seguida por digestão do vetor de expressão (pRSETA), a fim de verificar resultado positivo. Considerando que o gene sintético desenhado,

obtinha outros sítios de restrição que não *Xho*I e *HIND* III, optamos por utilizar outros dois sítios – *Mlu*I. A altura esperada para corte usando essa enzima de restrição é de aproximadamente 360pb. O plasmídeo de expressão usado neste experimento (pRSETA) possui sítios de restrição únicos para as enzimas utilizadas, foi observado que o fragmento de VP6, só era detectado quando uma digestão dupla dos vetores era realizada. Em reações onde essas enzimas foram utilizadas separadamente, não se observou a presença dos fragmentos. Desta maneira, constatou-se que os fragmentos estavam inseridos corretamente no vetor de expressão (figura 10B).

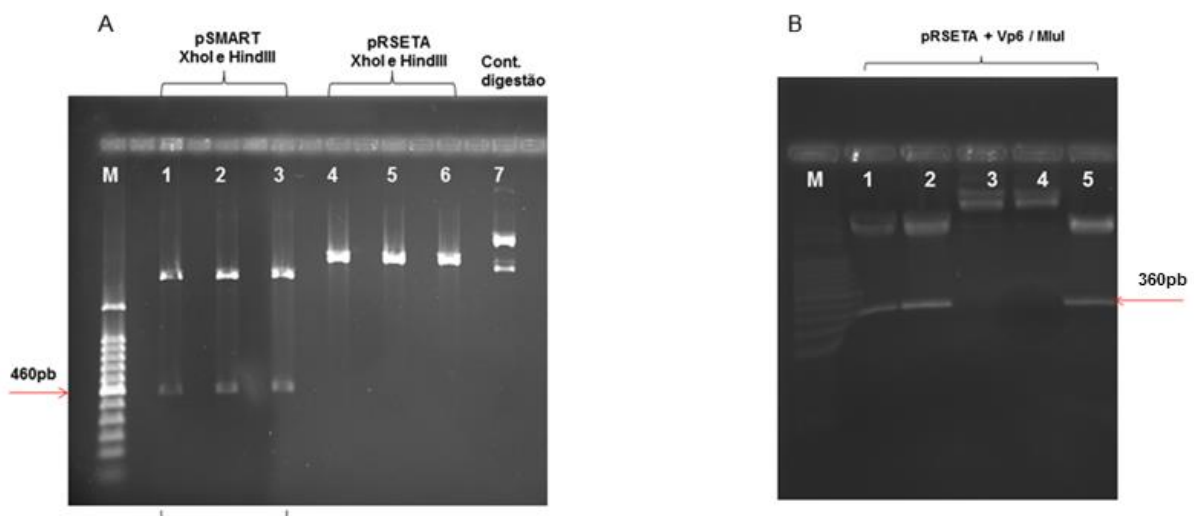


Figura 10: Subclonagem de VP6 em pRSETA. (A) Digestão do plasmídeo de clonagem pSMART e a presença dos fragmentos na altura esperada, aproximadamente 460 pb e digestão do plasmídeo de expressão pRSETA. Os Poços de 1-3 representam plasmídeo pSMART digerido com enzimas *Xho*I e *Hind*III, 4-6 representam plasmídeo de expressão pRSETA digerido com as enzimas *Xho*I e *Hind*III, o poço 7 é controle da digestão pRSET A sem enzimas. (B) Digestão do plasmídeo de expressão pRSETA e a presença dos fragmentos na altura esperada. Números 1-5 representam o pRSETA com a presença do inserto nas colônias 1,2 e 5 em aproximadamente 360 pb, Todos foram devidamente digeridos com a enzima de restrição *Mlu*I que tem dois sítios de inserção do plasmídeo. Para visualização da digestão foi realizada a eletroforese, no qual utilizou-se gel de agarose na concentração de 1.5%. Todas as canaletas apresentam o (M) marcador molecular de 100pb (*ladder*).

Além de verificar através de restrição enzimática a correta inserção do fragmento no vetor de expressão, foi realizada uma avaliação da qualidade do plasmídeo obtido através do sequenciamento das amostras pRSETA -VP6. A etapa de sequenciamento, confirmou a presença do gene VP6 subclonado em pRSETA. A partir da sequência de nucleotídeos, realizamos uma análise de similaridade com amostras depositadas no banco de sequência gênicas do NCBI utilizando a ferramenta gênica “blast n“. A análise do sequenciamento demonstrou que a pRSETA - VP6 recombinante, produzida nesse estudo, teve similaridade com VP6 de Rotavírus.

4.4 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DO ANTÍGENO RECOMBINANTE VP6

A proteína VP6 foi expressa após 3 horas de indução na presença de IPTG, assim como identificado em VP4, essa proteína também mostrou ser insolúvel no lisado bacteriano. Foi observado na massa celular a presença da proteína em tamanho esperado de 21,7 kDa em SDS-PAGE (figura 11B). A revelação de um *western blot* utilizando anticorpo monoclonal anti-HisG (Invitrogen) confirmou a presença da cauda polihistidina da proteína recombinante purificada obtida (figura 11 A,C). Após confirmação da expressão da VP6, observou-se a proteína recombinante nas eluições de 100-300 mM de imidazol na purificação. A concentração da proteína fusionada a cauda de histidina ficou em torno de 1,0 a 2,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

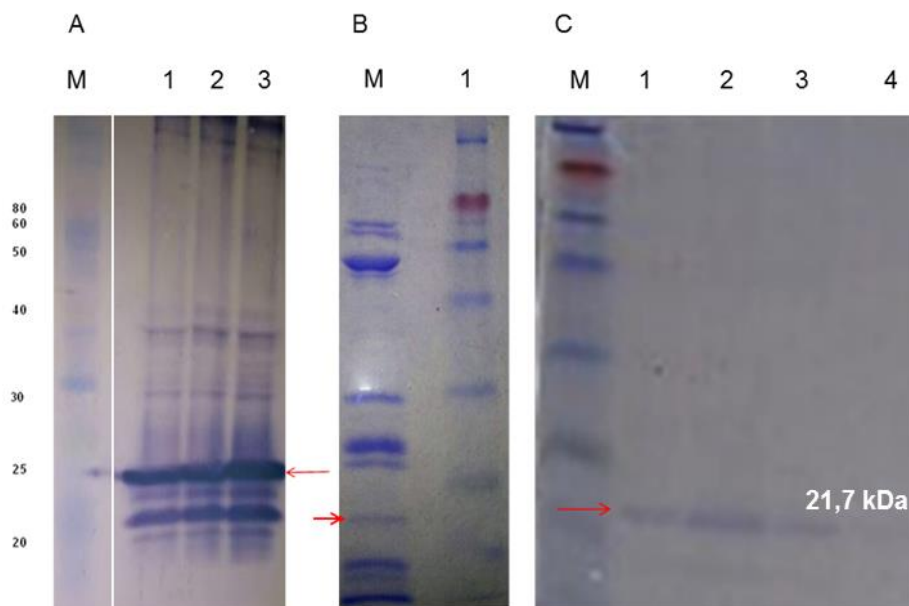


Figura 11: Expressão de proteína VP6 após três horas com o indutor IPTG. M. Marcador de proteína (A) *western- blot* 1-3: Proteína recombinante - *pellet* da proteína recombinante VP6 (altura da 21,7 kDa). (B) SDS PAGE 1: Pellet Proteína recombinante VP6 induzida com IPTG. (C) 1-4 *western blot* da proteína recombinante purificada VP6.

4.5 PRODUÇÃO DOS ANTICORPOS POLICLONAIS

4.5.1 Anti –VP6 coelho e camundongos

Com a proteína recombinante VP6 expressa e purificada, coelho e camundongos foram imunizados para obtenção de anticorpos policlonais anti VP6. As imunizações ocorreram a cada 15 dias, no total foram 4 inoculações. Assim como no procedimento realizado com a proteína recombinante VP4, um ensaio de ELISA indireto foi realizado,

para verificar a reposta de anticorpos às imunizações, usando soro de coelho diluído 1/100. Tanto o coelho quanto os camundongos responderam bem produzindo elevados títulos de IgG anti-VP6 em relação à proteína recombinante VP6 (figura 12).

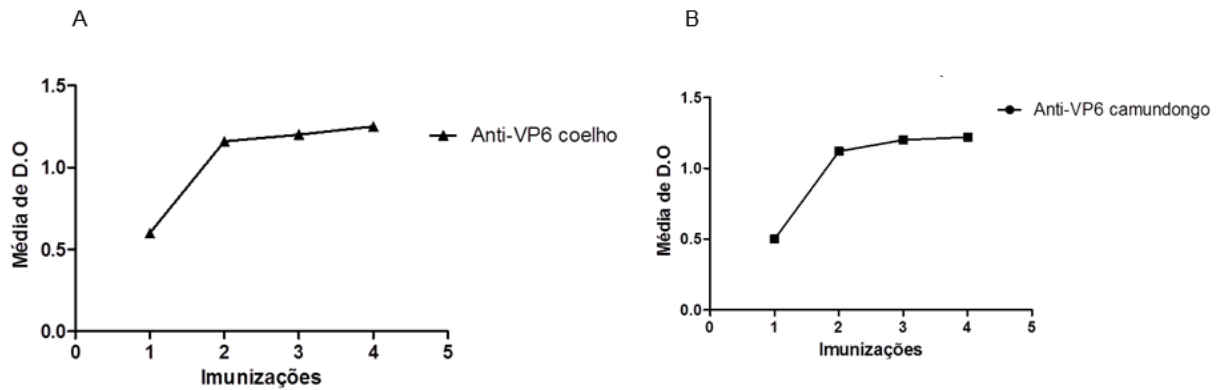


Figura 12: Imunizações com proteína recombinante VP6 em coelho e camundongos. A figura mostra um aumento na resposta imunológica dos animais, esses valores foram constatados por (ELISA), lidos no *Multiskan Ex-absorbance mode-filter 450*. (A) coelho anti VP6 (B) camundongo anti VP6.

4.6 TESTES PARA VALIDAÇÃO DOS ANTICORPOS POLICLONAIS PRODUZIDOS A PARTIR DA CONSTRUÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

4.6.1 *Western-blot* com amostra Rotavírus-WA com anti-VP4 e anti-VP6

Os anticorpos policlonais obtidos nesse estudo foram testados versus amostra Rotavírus WA, cultivada em ensaios celulares. Tendo como base um perfil eletroforético descrito por Teeimori e colaboradores (2014), que apresenta o padrão proteico das proteínas majoritárias de Rotavírus (figura 13A), os ensaios por *western-blot* mostraram que tanto anti-VP4 (figuras 13B) quanto o anti-VP6 (figuras 13C, D) reconheceram as proteínas VP4 e VP6 respectivamente.

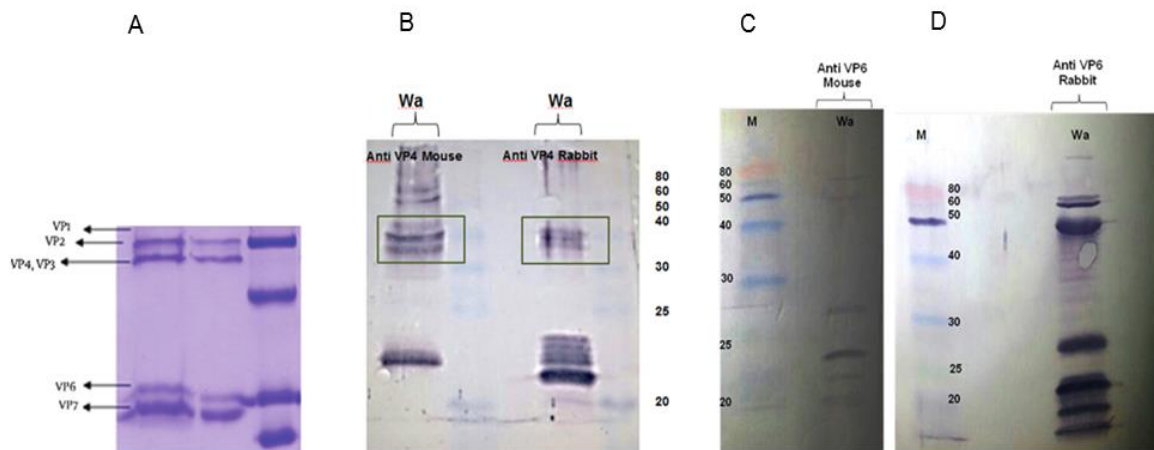


Figura 13: Western blot com amostras Rotavírus-WA com anti-VP4 e anti-VP6. (A) Perfil eletroforético via SDS PAGE de proteínas estruturais do Rotavírus humano retirado da publicação de Teeimoi e colaboradores (2014). (B) Western blot mostrando anti-VP4 camundongo e Anti-VP4 coelho detectando amostra desnaturada Rotavírus WA na altura correta da VP4 nativa. (C) Western blot mostrando anti-VP6 camundongo detectando amostra desnaturada WA Rotavírus na altura correta da VP6 nativa. (D) Western blot indicando anti-VP6 coelho detectando amostra desnaturada WA

Foi possível destacar que tanto anti-VP4 camundongo quanto anti-VP6 camundongo e anti-VP4 coelho como anti-VP6 coelho, reconheceram cruzadamente Rotavírus WA em diversos pontos, fato justificável por tratar-se de anticorpos policlonais. Porém, ambos os anticorpos marcaram banda na posição específica ao ser, conforme observado na figura 13A, que mostra o padrão observado nos estudos de Teeimori e colaboradores, 2014.

4.7 ANÁLISE DE ANTI- VP4 e ANTI-VP6 DE COELHO POR CITOMETRIA DE FLUXO

4.7.1 Caracterização dos IgGs anti-VP4 de coelho

Foi observado na citometria de fluxo uma média de intensidade de fluorescência dos IgG anti VP4 com as células MA₁₀₄ sadias, uma vez que a amostra positiva (MA₁₀₄ infectada com Rotavírus WA marcada com IgG anti VP4) apresentou nível de reatividade menor que a amostra negativa (MA₁₀₄ sadia marcada com IgG anti VP4) e o controle da reação usado no ensaio (MA₁₀₄ sadia marcada apenas com o conjugado de

coelho Alexa flour) não fluoresceu, o que demonstrou uma reatividade cruzada (figura 14).

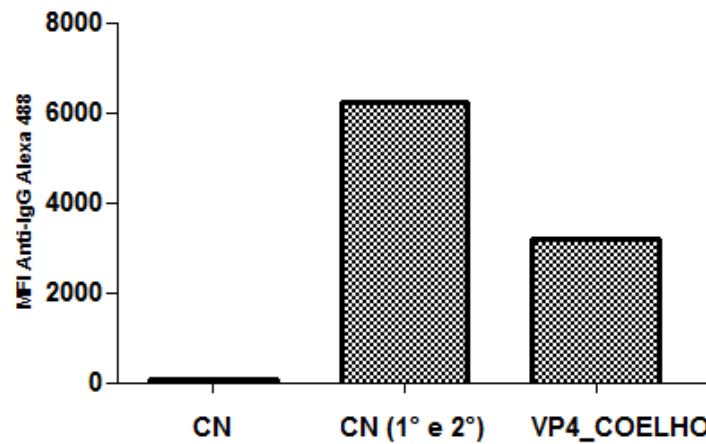


Figura 14: Caracterização de IgG de coelho anti VP4. CN- célula normal (sadia) marcada apenas com o conjugado anti IgG de coelho *Alexa flour*. CN 1º e 2º: células MA₁₀₄ sadias marcadas com IgG de coelho anti VP4 mais conjugado ao *Alexa flour*. VP4 coelho: Célula infectada e marcada com igG de coelho anti VP4 mais conjugado ao *Alexa flour*.

4.7.2 Caracterização dos IgGs anti-VP6 de coelho

O ensaio foi realizado durante 6 dias consecutivos de infecção *in vitro* de Rotavírus WA em célula MA₁₀₄ (figura 15A). A morfologia da célula MA₁₀₄ foi monitorada e somente as células selecionadas de acordo com a granulose e tamanho destacadas na forma geométrica foram avaliadas (figura 15B) Em cada dia foi realizado marcação com anti-VP6 e revelados com anticorpos anti IgG conjugados com *Alexa flour* 488 por Citometria de fluxo (figura 15C-D). O gráfico mostra a média de intensidade de fluorescência - MFI de células MA₁₀₄ infectadas com Rotavírus WA e aumento da MFI até o 5º dia, o que validou os IgG anti-VP6 como uma possível ferramenta para um sistema de detecção de Rotavírus do tipo A. Além disso observou-se que no 6º dia houve queda do nível de intensidade da fluorescência, provavelmente pelo efeito citopático e consequente diminuição do reconhecimento.

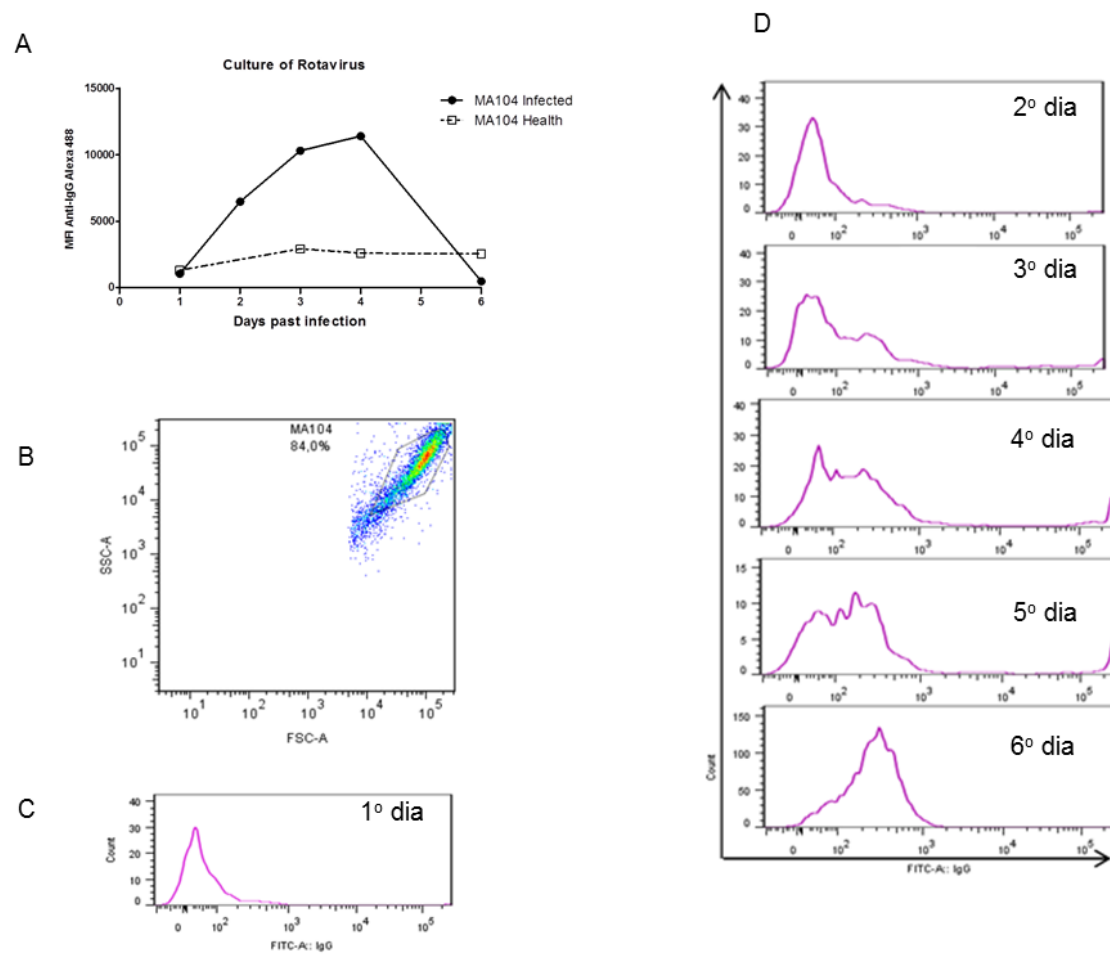


Figura 15: Caracterização dos anticorpos anti-VP6 em cultura in vitro de Rotavirus. (A) Curva de crescimento de MA₁₀₄ normal e infectados por Rotavírus WA. **(B)** Seleção das amostras por tamanho e complexidade **(C)** média de intensidade de fluorescência de células MA₁₀₄ sadias com IgG anti-VP6 marcadas com anticorpos *Alexa flour 488* no 1º dia infecção **(D)** Acompanhamento da média de intensidade de fluorescência de células MA₁₀₄ infectadas com anti-VP6 e anti-igG *Alexa flour 488* até o 6º dia.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Devido as crescentes taxas de morbidade e mortalidade causada por Rotavírus humanos, métodos de detecção têm sido empregados rotineiramente em estudos clínicos epidemiológicos. Para o controle das rotaviroses é primordial a identificação precisa dos agentes envolvidos, de modo a se estabelecerem medidas profiláticas direcionadas. Para tanto, o diagnóstico das infecções por Rotavírus baseia-se na detecção das partículas, antígenos ou RNA virais a partir de material fecal (SMITH et al. 1993; HUGHES 1993; O'RYAN et al. 2001). Um método de triagem rápido, facilmente utilizável para detectar o Rotavírus em amostra fecal é tido como apropriado para a aplicação de triagem em grandes grupos de pacientes (SILVEIRA, 2005).

Pesquisas têm demonstrado que as proteínas estruturais presentes no capsídeo externo de Rotavírus VP7 e VP4 são alvos de anticorpos que neutralizam o Rotavírus in vitro (S.J.DUNN et al.,1995) e essas proteínas tem sido escolha para montagem de um sistema rápido de detecção.

Responsável pelo genótipo P, VP4 é uma proteína não glicosilada que se projeta na forma de espículas na superfície do capsídeo externo do vírus e está relacionada com diferentes funções incluindo adesão à célula, internalização, hemaglutinação, neutralização e virulência (CRAWFOARD et al., 2001; PRASAD et al., 1990; OFFIT, BLAVAT,1986; LOPEZ et al., 1985).

Os 161 aminoácidos escolhidos para a produção de proteína recombinante VP4 corresponderam a um domínio hemaglutinina importante na indução de anticorpos neutralizantes à ligação ao ácido N-acetilneuraminico da superfície celular do hospedeiro (SUZUKI et al., 1985, SVENSSON et al., 1987, CONNER et al, 1988). O ácido N-acetilneraminico, ou ácido siálico é o receptor celular para algumas cepas de Rotavírus. Sugere-se que a porção VP8 interaja com um receptor que contenha ácido siálico (ISA et al., 2006), pois resíduos que têm contato com o ácido siálico são conservados em cepas de Rotavírus (DORMITZER et al., 2002). Nesse estudo a porção VP8, foi à região escolhida para produção de antígeno recombinante VP4.

Referente à clonagem, expressão em hospedeiro *E.coli* e purificação da proteína VP4 obtivemos sucesso, visto que no sequenciamento tanto do vetor de clonagem,

quanto do vetor de expressão houve um excelente índice de significância na avaliação do eletroferograma.

Foi observada insolubilidade da VP4 recombinante produzida, Khodabandhloo M e colaboradores (2009), também obtiveram a proteína expressa do gene VP4 do Rotavírus, porém em hospedeiro *Baculovirus*, onde se observou insolubilidade da proteína VP4, os autores concluíram que essa proteína recombinante, tem um potencial para o desenvolvimento de vacina contra Rotavírus. A característica relacionada à insolubilidade de VP4 parece ser comum entre proteínas recombinantes produzidas desse gene, estudos de Larralde e Goziglia (1992), Kovacs – Nolan e colaboradores 2001 e Favacho e colaboradores 2006 apontam a mesma particularidade.

Observou-se que IgG de camundongo e coelho anti-VP4 reconheceram amostra padrão de Rotavírus WA em sua forma desnaturada, como exibida na (figura 13 B) que mostra o *Western blot* com alvo para WA de Rotavírus, o que de modo positivo reflete estratégias de uso para os anticorpos anti-VP4 obtidos a partir da proteína recombinante. Estudos de Zhao e colaboradores, 2007 também produziram recombinante VP4 expressa em *E.coli* B121 (DE3) pLysS, seus resultados afirmam que a proteína possui reatividade imuno-específica e pode ser facilmente reconhecida por cepas de Rotavírus WA ou SA11. Porém em nosso estudo, foi possível observar que a proteína recombinante VP4, usada na produção dos anticorpos policlonais para detecção de Rotavírus, como uma possível ferramenta de diagnóstico não teve o efeito esperado, devido à reatividade cruzada com células epiteliais de rim de macaco nos ensaios para detecção da cepa WA pela citometria de fluxo.

Assim como observado que anticorpos protetores e neutralizantes induzidos em animais ou seres humanos, após uma infecção por Rotavírus, são dirigidos classicamente contra a VP4 e VP7 (OFFIT & BLAVAT,1986), estudos apontam que VP6 também induz a produção dos mais altos títulos séricos desses anticorpos após infecções em humanos (AIYEGBO et al., 2013). A proteína VP6 está presente no capsídeo interno, representa 51% da massa viral e é considerada a principal portadora dos determinantes antigênicos, muitos dos quais permitem a classificação de grupos e subgrupos (ESTES & KAPIKIAN, 2007). Muitos trabalhos tem escolhido essa proteína para produção de recombinantes, devido ter importante papel na indução da imunidade

protetora (EL-SENOUSY WM et al., 2013) também observou-se que a maioria dos kits diagnósticos incluem anticorpos policlonais ou monoclonais dirigidos a esse antígeno (ESTES & COHEN 1989).

A análise de predição de epítomos da VP6 permitiu a seleção de três domínios imunodominantes, que foram deduzidos como sendo mais expostos pela conformação espacial. Por meio de bioinformática um gene sintético contendo as sequências destes domínios foi elaborado, direcionando os códons mais reconhecidos para expressão proteica em *Escherichia coli*. Diferente da estratégia elaborada com a recombinante VP4, o desenho deste gene sintético possibilitou rapidez e praticidade na construção e na purificação da VP6. Estudos comprovam que peptídeos sintéticos abrangendo diferentes regiões da proteína VP6, foram capazes de induzir altos títulos de anticorpos (REDMOND et al., 1991; FRENCHICK et al., 1992). Andrea Peralta e colaboradores (2009) indicaram VP6 como excelente portador de epítomos que reconhecem Rotavírus atípicos, nos seus estudos um sistema de expressão em *Baculovirus* recombinante foi montado para produzir proteínas a partir de estruturas multiméricas, através da técnica de *western blot* observaram reconhecimento à amostra nativa. Estudos de Theng Y e colaboradores (2014) mostram que proteínas quiméricas VP6 e VP4 induziram anticorpos em animais.

Assim como feito para VP4 recombinante, a expressão para VP6 recombinante produzida nesse estudo foi realizada usando o vetor de expressão *E. coli* B121 (DE3) pLysS, observou-se que VP6-pRSET também apresentava característica de insolubilidade, assim como VP4-pRSET. Rueda (2010), também observou em sua investigação que VP6 recombinante, expressa em *E. coli* B121 (DE3) pLysS, teve a mesma característica, a proteína estava presente na porção insolúvel do *pellet* bacteriano.

Os imunoenaios realizados confirmaram a capacidade dos anticorpos IgG anti VP6 de coelho e camundongo de reconhecerem a cepa WA de Rotavírus em sua forma desnaturada (*western blot*), assim como realizado por Zhu e colaboradores (2013) na detecção de Rotavírus porcino, e em sua forma nativa (Citometria de Fluxo). No estudo realizado por DE GOES e colaboradores (2008), resultados semelhantes foram obtidos ao se trabalhar com parte do segmento 6 correspondente à porção N-terminal

conservada da VP6, expresso em *Escherichia coli*. A propriedade imunológica da VP6 recombinante foi avaliada por *Western blot* e pela capacidade de indução de anticorpos policlonais anti-VP6 recombinante em coelho. O soro policlonal produzido foi conjugado com um apoio de látex para a detecção de Rotavírus em amostras de fezes. Os resultados indicaram significativos índices de sensibilidade e especificidade contra o grupo Rotavírus A.

De acordo com Bosch A e colaboradores (2004), a utilização da técnica de citometria de fluxo para detecção de infecção por Rotavírus é muito útil, já que realiza o duplo objetivo de aumentar a quantidade de material do alvo, incorporando um ensaio de nível de infecção. A utilização dessa técnica em nosso estudo foi de fato bastante promissora, observamos rapidez, qualidade analítica e eficiência nos ensaios. Alguns autores afirmam que a citometria de fluxo têm se tornado importante ferramenta com amplas aplicações, como por exemplo, contar, examinar e classificar partículas microscópicas suspensas em meio líquido em fluxo, com a análise de vários parâmetros simultaneamente. Utilizando-se um aparelho de detecção óptico-eletrônico é possível a realização de análises de características físicas e/ou químicas de uma simples célula (BERGQUIST et al., 2009).

O ensaio imunoenzimático ELISA também foi utilizado nesse trabalho para avaliar os anticorpos policlonais obtidos – anti VP4 e Anti VP6 (dados não mostrados). Diversos trabalhos demonstram que o teste de ELISA possui valores de sensibilidade que variam entre 70-98% aproximadamente. Sua especificidade apresenta-se variável (70-100%) e depende do antígeno empregado (MANCIANTI et al., 1996; ROSARIO et al., 2005, METTLER et al., 2005). A utilização de antígenos recombinantes tem aumentado consideravelmente a especificidade dessa técnica (BURNS et al., 1993; SCALONE et al., 2002; CARVALHO et al., 2003), entretanto, reações cruzadas ainda podem ocorrer (BADARÓ et al., 1996). Em nosso trabalho algumas dificuldades foram encontradas, como a reatividade cruzada com amostras fecais negativas. Uma possível explicação para isto é o fato de ter sido utilizado *E. coli* como hospedeiro para produção da proteína recombinante. Impurezas remanescentes do processo de purificação da proteína em coluna de níquel podem ter induzido a geração anticorpos capazes de reconhecer *E. coli* comuns da flora intestinal humana. O ensaio de citometria demonstrou a capacidade dos anticorpos gerados de reconhecer Rotavírus na sua forma

nativa, porém o ELISA nos indicou a necessidade de melhoramentos futuros para obtenção de ferramentas mais eficientes. Algumas alternativas seriam a adição de métodos que aumentem o grau de pureza da proteína recombinante, a troca do hospedeiro de expressão (como para *Bacillus subtilis* ou *Pichia pastoris*), ou o desenvolvimento de anticorpos monoclonais anti-VP6.

A intenção desta pesquisa foi desenvolver proteínas recombinantes capazes de induzir a produção de anticorpos funcionais para detecção de Rotavírus do grupo A. A cerca dos produtos obtidos (VP4 e VP6), o reconhecimento do vírus nativo na cultura da célula MA₁₀₄, infectada pelos anticorpos anti VP6, justifica uma avaliação futura do sistema de captura de antígeno em amostras fecais através de ELISA. Estas reações imunoenzimáticas por captura de antígeno diretamente do material fecal, como os kits comerciais, são úteis no diagnóstico rápido para evitar um quadro de diarreia grave principalmente em crianças de baixa faixa etária (ESTES & KAPIKIAN 2007).

Embora produtos como esses já existam no mercado, os resultados mostrados aqui suportam que os anticorpos policlonais ou monoclonais gerados a partir desta proteína VP6 recombinante poderiam vir a ser utilizados como ferramentas de sistemas para diagnóstico para Rotavírus. De acordo com estudos de Zhu e colaboradores (2013), anticorpos policlonais anti VP6 pode ser usada como bom reagente de diagnóstico para a detecção de Rotavírus.

Em relação aos aspectos de propriedade intelectual, a busca relacionada ao uso desses produtos no Brasil não indicou existir impasse, primeiro porque as patentes encontradas ou estão a mais de 20 anos ativas ou estão ligadas a um sistema diferente da utilizada aqui. Assim a utilização de genes sintéticos construídos por sequências quiméricas como foi à construção da VP6 possibilitaria investimentos em comercialização do sistema aqui desenvolvido.

INTRODUÇÃO

CONCLUSÃO

- ✓ A região da proteína VP4 selecionada para a geração de IgG de camundongo e coelho anti-VP4 foi eficiente para o reconhecimento do antígeno nativo em sua forma desnaturada, como foi possível observar no ensaios de *western blot*.
- ✓ Análise de citometria demonstraram que os mesmos anti-VP4 gerados não foram específicos o suficiente para serem utilizados em técnicas onde a proteína VP4 está em sua forma nativa.
- ✓ As regiões selecionadas para a produção da proteína VP6 foram eficientes para a geração de anticorpos anti-VP6 capazes de reconhecer a proteína nativa em sua forma desnaturada e não desnaturada. Futuros trabalhos terão como objetivo o aumento da especificidade dos anticorpos obtidos de modo a permitir sua aplicação em um maior número de imunoenaios.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, M.; ITO, N.; MARIKAWA, S.; TAKASU, M.; MUKAWAI, Y.; KOHARA, J.; SUGIYAMA, M. **Molecular epidemiology of rotaviruses among healthy calves in Japan: Isolation of a novel bovine Rotavirus bearing new P and G genotypes.** *Virus Res.* V,144. P.250-7, 2009.

AIYEGBO MS, SAPPARAPU G, SPILLER BW, ELI IM, WILLIAMS DR, KIM R, LEE DE, LIUT, LI S, WOODS VL JR, NANNEMANN DP, MEILER J, STEWART PL, CROWE JE JR. **Human rotavirus VP6-specific antibodies mediate intracellular neutralization by binding to a quaternary structure in the transcriptional pore.** *PLoS One.* v. 5 9;8. P. 58-64, 2013.

BADARÓ R, BENSON D, EULÁLIO MC, FREIRE M, CUNHA S, NETTO EM, PEDRAL-SAMPAIO D, MADUREIRA C, BURNS JM, HOUGHTON RL, DAVID JR, REED SG. **rK39: a cloned antigen of Leishmania chagasi that predicts active visceral leishmaniasis.** *J Infect Dis.* P. 173(3):758-61, 1996.

BERGQUIST, P.L., HARDIMAN, E.M., FERRARI, B.C., AND WINSLEY, T. **Applications of flow cytometry in environmental microbiology and biotechnology chromatography, a new approach to protein fractionation.** *Nature*, 1975.

BISHOP RF.; DAVIDSON GP.; HOLMES LH.; RUCK BJ. **Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with viral gastroenteritis.** *Lacet.* P.1281-1283, 1973.

BOSCH A, PINTÓ RM, COMAS J, ABAD FX. **Detection of infectious rotaviruses by flow cytometry.** *Methods Mol Biol*, P. 268:61-8, 2004.

BRASIL, MS - MINISTÉRIO DA SAÚDE, **Vigilância epidemiológica ampliada das doenças diarreicas agudas causadas por Rotavírus**, 2010. Disponível em: <http://www.portal.saude.gov.br>, acessado Março 2012.

BRASIL, MS – Ministério da Saúde. Sistema Nacional de Vigilância em Saúde: **Relatório de situação, Brasil**. Brasília, 2011.

BRASIL, MS-MINISTÉRIO DA SAÚDE. SISTEMA NACIONAL DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE: **Relatório de situação, Amazonas**. Brasília, 2011 b.

BRASIL, SECRETARIA DE VIGILANCIA EM SAÚDE. Departamento Geral de doenças transmissíveis. **Doença Diarreica Aguda (dados)**. Brasília, 2010. portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/16_acre_final.pdf – Acesso em: 10 de fevereiro de 2012.

BROWN, DH.; MATHAN, MM.; MATHEW, M.; MARTIN, R.; BEARDES, GM.; MATHAN, VL. **Rotavirus epidemiology in Vellore, South India: group, subgroup, serotype and electropherotype**. Journal of Clinical Microbiology, Washington, v. 26, n. 11, P. 2410-2414, 1988.

BURNS EA, LUM LG, L'HOMMEDIEU G, GOODWIN JS. **Specific humoral immunity in the elderly: in vivo and in vitro response to vaccination**. J Gerontol. Nov;48(6): P. 231-6, 1993.

CARMO EH. **Diarrheic disease due to rotavirus: magnitude, introduction of the vaccine, and challenges for epidemiological surveillance**. Cad Saude Publica, 2006.

CARMO EH.; **Diarreia e Rotavírus**. Revista de Saúde Pública. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rsp/v38n6/14.pdf.p.6>, 2011.

CARVALHO-COSTA FA, VOLOTÃO EDE M, DE ASSIS RM, FIALHO AM, DE ANDRADE JDA S, ROCHA LN, TORT LF, DA SILVA MF, GÓMEZ MM, DE SOUZA PM, LEITE JP. **Laboratory-based rotavirus surveillance during the introduction of a vaccination program, Brazil, 2005-2009**. Pediatr Infect Dis J. 2011. CDC-CENTERS FOR DISEASE, CONTROL AND PREVENTION. **Text books and Publications**, 2012. Disponível em: <http://www.cdc.gov/rotavirus/index.html>. Acessado em mar.2013.

CHARPILLENNE A, LEPAULT J, REY F, COHEN J. **Identification of rotavirus VP6 esidues located at the interface with VP2 that are essential for capsid assembly and transcriptase activity.** J Virol. v.76 n.15 : P.7822-31. 2002.

CONNER ME, ESTES MK, GRAHAM DY. **Rabbit model of rotavirus infection.** J Virol. v. 62 n.(5) P. 1625-33,1988.

CORTHÉSY B, BENUREAU Y, PERRIER C, FOURGEUX C, PAREZ N, GREENBERG H, SCHWARTZ-CORNIL I. **Rotavirus anti-VP6 secretory immunoglobulin A contributes to protection via intracellular neutralization but not via immune exclusion.** J Virol. P. 80(21):10692-9. Epub 2006 Sep 6, 2006.

COSTA MS, NOGUEIRA PA, MAGALHÃES GF, TAQUITA P, MARIÚBA LA, PENATTI M, ORLANDI PP. **Rotavirus genotyping in gastroenteritis cases of an infantile population from Western Brazilian Amazonia.** Rev Soc Bras Med Trop.;45(4): P. 520-2, 2012.

CRAWFORD SE, MUKHERJEE SK, ESTES MK, LAWTON JA, SHAW AL, RAMIG RF, PRASAD BV. **Trypsin cleavage stabilizes the rotavirus VP4 spike.** J Virol. 2001.

DE GÓES AC, DE MORAES MT, DE CASTRO SILVEIRA W, ARAÚJO IT, DE H'ALLUIN JC, DA SILVA SOUZA W, DA SILVA JUNIOR JG, LEITE JP. **Development of a rapid and sensitive latex agglutination-based method for detection of group A rotavirus.** J Virol Methods, P. 410-49 Review. 2008.

DESSELBERGER U, MANKTELOW E, LI W, CHEUNG W, ITURRIZA-GÓMARA M, GRAY J. **Rotaviruses and rotavirus vaccines.** Review Br Med Bull, P.90:37-51. 2009.

DO CARMO GM, YEN C, CORTES J, SIQUEIRA AA, DE OLIVEIRA WK, CORTEZ-ESCALANTE JJ, LOPMAN B, FLANNERY B, DE OLIVEIRA LH,

CARMO EH, PATEL M. **Decline in diarrhea mortality and admissions after routine childhood rotavirus immunization in Brazil: a time-series analysis.** PLoS Med. 8(4): P. 1001 - 1024, 2011.

DORMITZER PR, SUN ZY, BLIXT O, PAULSON JC, WAGNER G, HARRISON SC. **Specificity and affinity of sialic acid binding by the rhesus rotavirus VP8* core.** J Virol (20). P.10512-7,2002.

DUNN SJ, FIORE L, WERNER RL, CROSS TL, BROOME RL, RUGGERI FM, GREENBERG HB. **Immunogenicity, antigenicity, and protection efficacy of baculovirus expressed VP4 trypsin cleavage products, VP5(1)* and VP8* from rhesus rotavirus.** Arch Virol.;140(11):1969-78.1995.

DUSSETY P.; VELASQUÉZ F.R; et al. **Evaluation of the second generation of a commercial latex agglutination test for the detection of rotavirus antigens in fecal samples.** Journal of Clinical Virology. V. 57. P. 3, 2013.

EL-SENOUSY WM, SHAHEIN YE, BARAKAT AB, GHANEM HE, EL-HAKIM AE, AMEEN SM. **Molecular cloning and immunogenicity evaluation of rotavirus structural proteins as candidate vaccine.** Int J Biol Macromol. P. 59:67-71. 2013.

ESTES, M. K.; COHEN, J. **Rotavirus gene structure and function.** Microbiol. Rev., v. 53: p. 410-49, 1989.

ESTES, M. K.; KAPIKIAN, A. Z. **Rotaviruses.** In: **Fields Virology**, edited by D. M. Knipe and P. M. Howley, Philadelphia:Lippincott Williams & Wilkins, P. 1917-1974, 2007.

FAUQUET, C. M.; MAYO, M. A.; MANILOFF; J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L. A. **Virus taxonomy.** Eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses., San Diego, CA: Academic Press., p. 447-496, 2007.

FAVACHO AR, KURTENBACH E, SARDI SI, GOUVEA VS. **Cloning, expression, and purification of recombinant bovine rotavirus hemagglutinin, VP8*, in Escherichia coli.** *Protein Expr Purif*, 46(2):196-203, 2006.

FENG N, LAWTON JA, GILBERT J, KUKLIN N, VO P, PRASAD BV, GREENBERG HB. **Inhibition of rotavirus replication by a non-neutralizing, rotavirus VP6-specific IgA mAb.** *J Clin Invest*,109(9): P.1203-13, 2002.

FERNANDES JV.; FONSECA S.M.D.; AZEVEDO J.C.D.; MARANHÃO H.S.; FONSECA M.H.M.; DANTAS M.T.; MEISSNER R.V. **Detecção de Rotavírus nas fezes de criança com diarreia aguda.** *Jornal de Pediatria*, Rio de Janeiro, v. 76 (4), P.300-304, 2002.

FLEWEET, TH & WOODE, GN. **The rotaviruses. Brief review.** *Arch. Virol.*, 57 (1): pág. 1-23, 1973.

FRENCHICK PJ, SABARA MI, READY KF, BABIUK LA. **Biochemical and immunological characterization of a novel peptide carrier system using rotavirus VP6 particles.** *Vaccine.*;10(11): P.783-91, 1992.

GENTSCH J, SHIEH WJ, FEREBEE-HARRIS T, LYNCH M, BRESEE J, JIANG B,ZAKI SR, GLASS R. **Molecular and immunological methods to detect rotavirus in formalin-fixed tissue.** *J Virol Methods.* 2002

GOUVEA, V.; GLASS, R.I.; WOODS, P.; TANIGUCHI, K.; CLARK, H.F.; FORRESTER, B.; FANG, **RNA Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens.** *J Clin Microbiol.*, 28 (2): P..276-282, 1990.

GREIG SL, BERRIMAN JA, O'BRIEN JA, TAYLOR JA, BELLAMY AR, YEAGER MJ, MITRA AK. **Structural determinants of rotavirus subgroup specificity mapped by cryo-electron microscopy.** *J Mol Biol.* 10;356 (1): P.209-21, 2006.

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.

HOSHINO, Y.; KAPIKIAN, A. Z. **Rotavirus antigens**. In: Rotaviruses. Ed. R. F. Ramig. Berlin, Springer - Verlag, P. 180-227, 1994.

ICTV - COMITÊ INTERNACIONAL DA TAXONOMIA DE VÍRUS. **Taxonomia de Vírus: Classificação e Nomenclatura de Vírus**. San Diego: Elsevier, 2006.

ISA P, ARIAS CF, LÓPEZ S. **Role of sialic acids in rotavirus infection**. *Glycoconj J.* ;23(1-2):P.27-37. Review. 2006

JOSEPH SAMBROOK, E. F. FRITSCH, TOM MANIATIS *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, E. F. Fritsch, ed 2 Editora: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989

KAPIKIAN AZ.; CHANOCK RN. **Rotaviruses**. Field's virology 3 ed. Philadelphia: Lincocot-Raven Publishers, P. 1657-1708,2002.

KAPIKIAN, A.Z; HOSHINO, Y.; CHANOCK R.M. **Rotaviruses** IN: KNIPE DM, HOWLEY PM, GRIFFIN DE. Editors. *Filds virology*. 4 th Philadelphia. Lippincott Williams & Wilsins.; P. 1787-833, 2001.

KAPKIAN AZ.; WYATT R.G; DOLIN R; THORNHILL T.S; KALICA A.R; CHANOCK R.M. **Visualization by immune electron microscopy of a 27 nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis**. *J Virol*. 10. P. 1075-81,1972.

KHODABANDEHLOO M, SHAMSI SHAHRABADI M, KEYVANI H, BAMBAL B. **Cloning and expression of simian rotavirus spike protein (VP4) in insect cells by baculovirus expression system**. *Iran Biomed J*. Jan;13(1):P.9-18, 2009.

KIM HH, MATTHIJNSSENS J, KIM HJ, KWON HJ, PARK JG, SON KY, RYU EH, KIM DS, LEE WS, KANG MI, YANG DK, HYUN BH, PARK SI, PARK SJ, CHO KO. **Full-length genomic analysis of porcine G9P[23] and G9P[7] rotavirus strains isolated from pigs with diarrhea in South Korea**. *Infect Genet Evol*. 2012.

KOVACS-NOLAN J, SASAKI E, YOO D, MINE Y. **Cloning and expression of human rotavirus spike protein, VP8*, in Escherichia coli.** Biochem Biophys Res Commun. 20;282(5):P.1183-8 (2009).

LARRALDE G, GORZIGLIA M. **Distribution of conserved and specific epitopes on the VP8 subunit of rotavirus VP4.** J Virol, P. 66(12):7438-43, 1992.

LARRALDE, G.; GORZIGLIA, M. **Distribution of Conserved and Specific Epitopes on the VP8 Subunit of Rotavirus VP4.** Journal of Virology, v.66, n.12, p.7438-7443, 1992.

LARRALDE, G.; LI, B.; KAPIKIAN, A.Z.; GORZIGLIA, M. **Serotype-Specific Epitope(s) Present on the VP8 Subunit of Rotavirus VP4 Protein.** Journal of Virology, v.65, n.6, P.3213-3218, 1991.

LEITE JP, 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 141: 2365-2374, 1996.

LIGHT J.S.; HODES HL. **Isolation from cases of infantile diarrhea of a filterable agent causing diarrhea in calves.** J Exp Med 90:13,1943.

LINHARES A.C.; PINHEIRO, F. P.; SCHMETZ C.; MUELLER G.; PETERS, **D.Duovírus (Rotavírus) em Belém do Pará, Brasil.** Rev. Inst. Med. Trop. V.19 P. 278-279, 1977.

LINHARES AC. **Epidemiologia das infecções por Rotavírus no Brasil e os desafios para o seu controle.** Cad Saúde Publica; 16:629-46, 2000.

LIPRANDI F, GERDER M, BASTIDAS Z, LÓPEZ JA, PUJOL FH, LUDERT JE, JOELSSON DB, CIARLET M. **A novel type of VP4 carried by a porcine rotavirus strain.** Virology. 315(2): P.373-80. 2003.

LIU, M.; OFFIT, P. A.; ESTES, M. K. **Identification of the simian rotavirus SA11 genome segment 3 product.** *Virology*, v. 163, P. 26-32, 1988.

LÓPEZ S, ARIAS CF, BELL JR, STRAUSS JH, ESPEJO RT. **Primary structure of the cleavage site associated with trypsin enhancement of rotavirus SA11 infectivity.** *Virology*. 15;144(1): P.11-9, 1985

LUIZ YURANY MORENO RUEDA. **Expresión y purificación de las proteínas recombinantes estructurales VP5, VP6, VP8.** Universidade Nacional de Colombia. Departamento C. B. Maestría en bioquímica. Facultad de Medicina.

MAGALHÃES GF, NOGUEIRA PA, GRAVA AF, PENATI M, SILVA LH, ORLANDI PP. **Rotavirus and Adenovirus in Rondônia.** *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 102(5): P.555-7. 2007.

MANCIANTI F, PEDONESE F, POLI A. **Evaluation of dot enzyme-linked immunosorbent assay (dot-ELISA) for the serodiagnosis of canine leishmaniosis as compared with indirect immunofluorescence assay.** *Vet Parasitol*. P. 15;65(1-2):1-9. 1996.

MASCARENHAS JDP, LINHARES AC, GABBAY YB, LIMA CS, OLIVEIRA DS, LIMA JC, MACEDO O, LEITE JPG, **Molecular characterization of VP4 and NSP4 genes from Rotavirus strains infecting neonates and young children in Belem, Brazil,** *Virus Res*. 126: P.149-158, 2007.

MASON, B. B.; GRAHAM, D. Y.; ESTES, M. K. **Biochemical mapping of the simian rotavirus SA11 genome.** *J. Virol.*, v. 46, P. 413-23, 1983.

MATHEWS, R.E.F. **The classification and nomenclature of viruses: summary of results of meeting of the International Committee on Taxonomy of viruses the Hague.** *Intervirology* vol. 01, P.133-135, 1978.

MATHIEU M, PETITPAS I, NAVAZA J, LEPAULT J, KOHLI E, POTHIER P, PRASAD BV, COHEN J, REY FA. **Atomic structure of the major capsid protein of**

rotavirus: implications for the architecture of the virion. EMBO J. Apr 2;20(7):P.1485-97,2001.

MATTHIJNSSENS J, VAN RANST M. **Genotype constellation and evolution of group A rotaviruses infecting humans.** Curr Opin Virol. 2(4):P. 426-33. 2012

MCKINNEY BA, KALLEWAARD NL, CROWE JE JR, MEILER J. **Using the natural evolution of a rotavirus-specific human monoclonal antibody to predict the complex topography of a viral antigenic site.** Immunome Res. 2007

METTLER M, GRIMM F, CAPELLI G, CAMP H, DEPLAZES P. **Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic Leishmania infections in dogs.** J Clin Microbiol. Nov;43(11):5515-9, 2005.

MUNFORD V, GILIO AE, DE SOUZA EC, CARDOSO DM, CARDOSO DD, BORGES AM, COSTA PS, MELGAÇO IA, ROSA H, CARVALHO PR, GOLDANI MZ, MOREIRA ED JR, SANTANA C, EL KHOURY A, IKEDO F, RÁCZ ML. **Rotavirus gastroenteritis in children in 4 regions in Brazil: a hospital-based surveillance study.** J Infect Dis. 2009

OFFIT PA, CLARK HF, BLAVAT G, GREENBERG HB. **Reassortant rotaviruses containing structural proteins vp3 and vp7 from different parents induce antibodies protective against each parental serotype.** J Virol. 60(2): P.491-6. 1986

OLIVEIRA C.S.; LINHARES A.C. **Rotavírus: Aspectos clínicos e prevenção.** Jornal de Pediatria, Rio de Janeiro, v.75, Supl. 1, P. s91-s102, 1999.

OMS – organização mundial de saúde. **Dados estatísticos de saúde,** 2011. Disponível em:

http://www.who.int/gho/publication/whrld_health_statistics/en/index.html.

Acessado fev.2012.

OMS – Organização Mundial de Saúde/ United Nations Children Found. **Countdown to 2015. Materna I / Newborn and survival**. United States of America, P. 228, 2012.

ORLANDI, P.P.; MAGALHAES, G.F.; MATOS N.B.; SILVA, T.; PENATTI M.; NOGUEIRA P.A.; PEREIRA DA SILVA, L.H. **Etiology of diarrheal Infections in Children of Porto Velho (Rondônia, Western Amazon region, Brazil)**. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil, v. 39 (4), P.507-517, 2006.

PARASHAR, V.D.; HOLNAN, R.C.; CLARKE, M.J.; BRESEE, J.S.; GLASS, R.I. **Hospitalization associated with rotavirus diarrhea in the United States, 1993 through 1995: surveillance based on the new ICD-9-CM rotavirus-specific diagnostic code**. The Journal of Infectious Diseases, Chicago, v. 177, n. 1, P. 13-17, 1998.

PARRA, G.I.; ESPÍNOLA, E.E.; AMARILLA A. A. ; STUPKA.; MARTINEZ, M.; ZUNINI, M.; GALEANO, M. E.; GOMES K.; ROSSONANDO, G.; ARBIZA, J. **Diversity of group A Rotavirus strains circulating in Paraguay from 2002 to 2005: detection of an atypical G1 IN South America**. J. Clin. Virol., v40, P. 135-41, 2007.

PATEL MM, LÓPEZ-COLLADA VR, BULHÕES MM, DE OLIVEIRA LH, BAUTISTA MÁRQUEZ A, FLANNERY B, ESPARZA-AGUILAR M, MONTENEGRO RENOINER EI, LUNA-CRUZ ME, SATO HK, HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ LDEL C, TOLEDO-CORTINA G, CERÓN-RODRÍGUEZ M, OSNAYA-ROMERO N, MARTÍNEZ-ALCAZAR M, AGUINAGA-VILLASENOR RG, PLASCENCIA-HERNÁNDEZ A, FOJACO-GONZÁLEZ F, HERNÁNDEZ-PEREDO REZK G, GUTIERREZ-RAMÍREZ SF, DORAME-CASTILLOR, TINAJERO-PIZANO R, MERCADO-VILLEGAS B, BARBOSA MR, MALUF EM, FERREIRA LB, DE CARVALHO FM, DOS SANTOS AR, CESAR ED, DE OLIVEIRA ME, SILVA CL, DE LOS ANGELES CORTES M, RUIZ MATUS C, TATE J, GARGIULLO P, PARASHAR UD. **Intussusception risk and health benefits**

of rotavirus vaccination in Mexico and Brazil. N Engl J Med. 16;364(24): P.2283-92. 2011.

PATEL NC, HERTEL PM, HANSON IC, KRANCE RA, CRAWFORD SE, ESTES M, PAUL ME. **Chronic rotavirus infection in an infant with severe combined immunodeficiency: successful treatment by hematopoietic stem cell transplantation.** Clin Immunol. 2012.

PATTON, J.T. HONES, M.T.; KALBACH, A.N; HE, Y.W.; XIAOBO, J. **Rotavírus RNA Polymerase requires the core shell protein to synthesize the double – stranded RNA genome.** J. Virol., V. 71 P. 9618-26, 2012.

PERALTA A, MOLINARI P, TABOGA O. **Chimeric recombinant rotavirus-like particles as a vehicle for the display of heterologous epitopes.** Virol J, P.6;6:192. . 2009.

PORATH J, CARLSSON J, OLSSON I, BELFRAGE G. **Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation.** Nature. 1975

PORTAL DA SAÚDE DO SUS. **Doença diarreica aguda,** 2014. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1549. Acessado em: fev.2013.

PRASAD BV, BURNS JW, MARIETTA E, ESTES MK, CHIU W. **Localization of VP4neutralization sites in rotavirus by three-dimensional cryo-electron microscopy.** Nature. 1;343(6257): P.476-9, 1990.

PRASAD, B. V. V.; CHIU, W. Structure of rotaviruses. In: **Rotaviruses**, edited by R. F. Ramig, Berlin:Springer-Verlag, p. 9-29, 1994.

QING-HUAN ZHAO, YU-LING WEN, YANG YU, QING DAI, YUAN-DING CHENS, **Expression and immunoreactivity of a human group a rotavirus VP4** Virologica Sinica August 2007, Volume 22, Issue 4, P. 287-293,2007.

RÁCZ M.L., KROEFF S.S., MUNFORD V., CARUZO T.A.R., DURIGON E.L., HAYASHI Y., GOUVEA V. & PALOMBO E. **Molecular characterization of porcine rotaviruses from the southern region of Brazil: Characterization of an Atypical genotype G[9] strain.** J. Clin. Microbiol. 38(6):P.2443-2446, 2000.

REDMOND MJ, OHMANN HB, HUGHES HP, SABARA M, FRENCHICK PJ, POKU SK, IJAZ MK, PARKER MD, LAARVELD B, BABIUK LA. **Rotavirus particles function as immunological carriers for the delivery of peptides from infectious agents and endogenous proteins.** Mol Immunol. 28(3):269-78,1991.

ROSE TL, MARQUES DA SILVA MF, GOMÉZ MM, RESQUE HR, ICHIHARA MY, VOLOTÃO EDE M, LEITE JP. **Evidence of vaccine-related reassortment of rotavirus, Brazil, 2008-2010.** Emerg Infect Dis P.19(11):P.1843-6,2013.

SALVADOR PT, DE ALMEIDA TJ, ALVES KY, DANTAS CN. [**The rotavirus disease and the oral human rotavirus vaccination in the Brazilian scenario: an integrative literature review**]. Cien Saude Colet. 2011.

SANDRA CA, ESTEVAM GK, PENATI M, SOARES LA, FERREIRA RG, ORLANDI PP, NAJLA BM. **Detection of rotavirus in children with acute gastroenteritis in Porto Velho, Rondonia, Brazil.** Arch Virol. May;159(5): P.1139-42,2014.

SARTORI AMC, VALENTIM J, DE SOÁREZ PC, NOVAES HM. **Rotavirus morbidity and mortality in children in Brazil.** Rev Panam Salud Publica.:23(2):92–100, 2008.

SCALONE A, DE LUNA R, OLIVA G, BALDI L, SATTÀ G, VESCO G, MIGNONE W, TURILLI C, MONDESIRE RR, SIMPSON D, DONOGHUE AR, FRANK GR, GRADONI L. **Evaluation of the Leishmania recombinant K39 antigen as a diagnostic marker for canine leishmaniasis and validation of a standardized enzyme-linked immunosorbent assay.** Vet Parasitol., 2;104(4):P.275-85, 2002.

SCHNEIDMAN-DUHOVNY D, INBAR Y, POLAK V, SHATSKY M, HALPERIN I, BENYAMINI H, BARZILAI A, DROR O, HASPEL N, NUSSINOV R, WOLFSON HJ. **Taking geometry to its edge: fast unbound rigid (and hinge-bent) docking.** Proteins. 2003

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DE SÃO PAULO. Divisão de Imunização e Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. Centro de Vigilância Epidemiológica "Prof. Alexandre Vranjac". Coordenadoria de Controle de Doenças. **Vacina contra Rotavírus.** Rev. Saúde Pública.; vol.40, n.2, P. 355-358, 2006.

SILVEIRA, WALDEMIR DE CASTRO. **Desenvolvimento de teste rápido para detecção de rotavírus: imunoensaio de captura e aglutinação em látex. 2005.** 61 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos) – Instituto de tecnologia em Imunobiológicos, em parceria com o Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2005.

SUZUKI H, SATO T, KITAOKA S, TAZAWA F, KONNO T, AMANO Y, ALPRECHT AA, VERA EG, VILLALTA JL, NUMAZAKI Y, et al. **A human atypical rotavirus found in an Ecuador infant with diarrhea.** Tohoku J Exp Med. 146(4): P.481-2, 1985.

SVENSSON L, SHESBERADARAN H, VESIKARI T, NORRBY E, WADELL G. **Immune response to rotavirus polypeptides after vaccination with heterologous rotavirus vaccines (RIT 4237, RRV-1).** J Gen Virol. ;68 (Pt 7): P.1993-9, 1987.

TENG Y, ZHAO B, PAN X, WEN Y, CHEN Y. **A new rotavirus VP6-based foreign epitope presenting vector and immunoreactivity of VP4 epitope chimeric proteins.** Viral Immunol. P. 27(3):96-104. 2014.

TOWBIN H, STAHELIN T, GORDON J. **Immunoblotting in the clinical laboratory.** J clin Chem Clin Biochem. 27(8):495-501. Review, 1989.

UNICEF/OMS – United Nations Children Found / Organização Mundial de Saúde. **UNICEF anuncia queda nas taxas de mortalidade na infância, 2013.** Disponível em: http://www.unicef.org/brazil/pt/media_9989.htm. Acessado em fev.2013.

VESIKARI T. **Rotavirus vaccination: a concise review**. Clin Microbiol Infect. 2012 Oct;18 Suppl 5:57-63. doi: 10.1111/j.P.1469-0691.2012.

VESIKARI T. **Rotavirus vaccination: a concise review**. Clinical Microbiology and infection. pág. 7, 2012. Virol. Nov;76 (Pt 11):P.2633-44. Review,1995.

WALDEMIR DE CASTRO SILVEIRA. **Desenvolvimento de teste rápido para detecção de rotavírus: imunoensaio de captura e aglutinação em látex**. Instituto Oswaldo Cruz instituto de tecnologia em imunobiológicos pós-graduação em biologia celular e molecular mestrado profissional em tecnologia de imunobiológicos, 2005.

WEI J, LI JT, ZHANG XP, TANG Y, WANG JX, ZHANG B, WU YZ. **Identification of an hla-a*0201-restricted cytotoxic t-lymphocyte epitope in rotavirus vp6 protein**. J Gen Virol, P.3393-6, 2006.

WINIARCZYK S., PAUL P.S., MUMMIDI S., PANEK R. & GRADZKI Z. **Survey of porcine rotavirus G and P genotype in Poland and the United States using RT-PCR**. J. Vet. Med. B, Infect. Dis. Vet. Public Hlth 49(8):P.373-378, 2002.

ZHU J, YANG Q, CAO L, DOU X, ZHAO J, ZHU W, DING F, BU RE, SUO S, REN Y, LI G, REN X. **Development of porcine rotavirus vp6 protein based ELISA for differentiation of this virus and other viruses**. Virol J. P.22;10:91, 2013.

ANEXOS



CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Protocolo nº 036/2013-CEEA/UFAM, intitulado como "Produção de um sistema "Lateral flow" a partir das proteínas de capsídeo interno (VP6) e externo (VP4) para o diagnóstico de Rotavírus" sob responsabilidade e orientação de **Dr. Paulo Afonso Nogueira** está de acordo com a Legislação Federal pertinente ao uso científico de animais e foi **APROVADO** pelo COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA-UFAM) em Reunião ocorrida em 08/08/2013.

Manaus, 14 de outubro de 2013.

Prof. Dra. Adriana Malheiro
Presidente da CEEA-UFAM

Detection of rotavirus in children with acute gastroenteritis in Porto Velho, Rondonia, Brazil

C. A. Sandra · G. K. Estevam · M. Penati ·
L. A. Soares · R. G. Ferreira · P. P. Orlandi ·
B. M. Najla

Received: 28 June 2013 / Accepted: 5 August 2013
© Springer-Verlag Wien 2013

Abstract Rotavirus group A (RVA) infection was ascertained in 591 fecal samples from children 0 to 6 years old with acute gastroenteritis. The vaccination status was also verified in all 591 subjects, with 302 (51.0 % ± 4.0 %) participants fully vaccinated against rotavirus. Forty-two of the vaccinated children (13.9 % ± 3.9 %) tested positive for RVA infection. Of the 289 unvaccinated children (49.0 % ± 4.0 %), 61 (21.1 % ± 4.7 %) had stools positive for RVA. This study suggests that the proportion of acute diarrhea cases caused by rotavirus was low and that the incidence of rotavirus diarrhea decreased over the study period in both vaccinated and unvaccinated children.

Keywords Rotavirus · Acute gastroenteritis · Children · Vaccine

Group A rotavirus (RVA) is the greatest causative agent of acute gastroenteritis in children [1, 2]. Each year, about 125 million of rotavirus-caused diarrhea cases are registered globally, causing 352,000–592,000 deaths in children under 5 years of age [3]. Due to the high

morbidity-mortality rate associated with diarrhea caused by RVA, the need for urgent measures such as the development of vaccines against this virus, with the main objective of attenuating the severity of the diarrheic disease, has become evident. In March 2006 the Rotarix® vaccine (monovalent (G1P[8]), strain RIX4414) was included in the Brazilian vaccination calendar [4]. Studies done in Brazil have reported a decline in diarrhea-related hospital admissions, with substantial declines in both the more-developed South and Southeast regions, as well as in the poorest regions of Brazil (North and Northeast), where socioeconomic and health indicators approximate those of less-developed countries. The new data indicate significant efficacy of the vaccine, with a 22 % reduction in gastroenteritis mortality and a 59 % decrease in hospitalization among children younger than five years of age in the post-vaccine years [5–7]. Data from immunization surveillance in Porto Velho, Rondonia, Brazil have demonstrated 84.74 % vaccine coverage.

The objective of the present study was to detect rotavirus infection in children with acute gastroenteritis over a 24-month period in the region of Porto Velho-Rondonia after the national rotavirus immunization program. Fecal samples were obtained from children 0 to 6 years of age who were hospitalized with a clinical status of gastroenteritis at the Cosme e Damião Children's Hospital, a public reference institution in the city of Porto Velho. The group of children that received the monovalent oral Rotarix® vaccine needed evidence of two doses of the vaccine against rotavirus according to the recommendation of the Federal Ministry of Health in order to be included in the study.

Samples were identified as positive for RVA by enzyme-linked immunosorbent assay (Rotaclone®) to

C. A. Sandra · G. K. Estevam · R. G. Ferreira · B. M. Najla (✉)
Laboratório de Microbiologia, Fundação Oswaldo Cruz,
Rondônia-Fiocruz, Porto Velho, RO CEP 78910-210, Brazil
e-mail: najla@ipepatro.org.br

M. Penati
Hospital Infantil Cosme e Damião, SESAU, Porto Velho, RO,
Brazil

L. A. Soares · P. P. Orlandi
Centro de Pesquisa Leônidas e Maria Deane, Fiocruz Amazônia,
Manaus, AM, Brazil

qualitatively detect the rotavirus antigen as described by the manufacturer.

The viral genome was directly extracted from samples by the TRIzol (TRIzol® Reagent (Invitrogen) method, using the technique described by Chomczynski *et al.* [8]. Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) was done to determine the rotavirus electrophoretic profiles according to the procedure described by Pereira *et al.* [9].

The positive RVA samples were genotyped by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) followed by multiplex nested-PCR using the primers described by Gentsch *et al.* [10] and Das *et al.* [11].

Statistical data analysis was done using classical methods. Ninety-five percent confidence intervals were determined for each comparison. The classical chi-square method in contingency tables was applied to test differences between categorical data (vaccination status, age group, RVA infection status and genotype), as well as Fisher's exact test for dichotomous data. Survival analysis was done using the Mantel-Cox log rank test. The test was applied to evaluate possible time-from-vaccination effects on RVA incidence.

The study was approved by the CEPEM (Rondonia Tropical Medicine Research Center) ethics committee, according to protocol no. 0113/2010.

A total of 591 fecal samples were collected. There were 103 (17.4 % ± 3.1 %) samples that tested positive for RVA. Samples that gave a positive result for RVA were subjected to PAGE analysis to confirm the results and to observe the electrophoretic profile of the viral genome.

The vaccination status was also verified in all 591 subjects, with 302 (51.0 % ± 4.0 %) of them fully vaccinated against rotavirus. Of these 302 vaccinated children, 42 (13.9 % ± 3.9 %) were infected with RVA. Two hundred eighty-nine (49.0 % ± 4.0 %) children were not vaccinated against RVA. Of the unvaccinated children, 61 (21.1 % ± 4.7 %) tested positive for RVA. When comparing the frequency of RVA in unvaccinated and vaccinated children, a relative risk of 1.09 (95 % C.I.: 1.01-1.17; $p = 0.022$) (Table 1) was observed. This result may also be expressed as an absolute reduction in the risk of RVA infection of 7.20 % (95 % C.I.: 1.09 %-13.31 %) in vaccinated children. Of the 103 rotavirus-positive samples, a total of 52 samples were successfully characterized by both G and P typing. The genotyping was done by RT-PCR combined with sequencing of the VP7 and VP4 genes. G9P [8] was the most prevalent genotype, detected in 94.2 % ± 6.3 % (49/52) of the samples, followed by G2P [4], with 3.8 % ± 5.3 % (2/52), and G1P [8] (1/52), with 1.9 % ± 3.7 %. Among the genotyped samples, it was verified that 28.5 ± 12.3 % (15/52) of the children had received two doses of the vaccine as recommended. In this study, the G1P [8] strain was detected in an unvaccinated

child, and the G9 frequency was verified in children that had received the two doses of the vaccine against rotavirus.

In Rio de Janeiro, children who received two doses of vaccine showed an RVA infection rate of 29 %, while the infection rate was 58 % among unvaccinated children [12]. Studies conducted in Recife showed that rotavirus diarrhea incidence was very low in vaccinated and unvaccinated children [13]. Even if we consider the small sample size, our data still suggest that there was a decrease in RVA prevalence after the introduction of the vaccine by the Brazilian National Immunization Program.

A comparison of vaccination rates between RVA-positive and negative children suggested that unvaccinated children were more likely to be infected with rotavirus. The distribution of RVA cases in relation to age group for the vaccinated and unvaccinated children was also analyzed. A high proportion of unvaccinated children over 40 months of age had RVA. This same phenomenon was not observed in the vaccinated children. On the other hand, a lower rate of infection was observed in vaccinated children, in disagreement with the concept that the number of RVA infections tends to decrease after two years of life [14].

Costa *et al.* showed, in studies done before vaccination against rotavirus, that the most frequent genotype identified was G1P [8], found in 66.7 % ± 12.6 % of samples, followed by G2P [4] in 22.2 % ± 11.1 %, G3P [8] in 7.41 % ± 7 % and G4P [8] 3.7 % ± 5.0 % [12]. Comparing the genotypes found in both studies done at the same hospital using the same methodology, significant differences were found between the observed frequencies of G2[P4], G1[P8], G9[P8] (Table 2).

In previous studies of children from different parts of Brazil, a predominance of RVA genotype G2P [4] was observed when compared to other genotypes [15–20]. The genotype frequencies found in this study show that the G9 genotype, associated with P [8] was the most prevalent, being found in 94.2 % ± 6.3 % (49/52) of the samples. Recent reports have described the expansion of G9, which has become the most frequent genotype in various parts of the world, including Brazil, with fluctuating frequencies, as expected for any rotavirus serotype [21–23]. In regard to G1P [8], studies have suggested that the apparent decline in the vaccine strain implies a high probability in the future of transmission from vaccinated individuals to unvaccinated contacts with serotypes different from the ones present in the vaccine [24].

Curiously, survival analysis showed that, in general, diarrhea episodes tended to occur three to four months later in vaccinated children than in unvaccinated children (Fig. 1, Mantel-Cox, log rank $X^2 = 20.8$, 1 d.f., $p < 0.000$, considering children up to 40 months old). This might be considered a positive effect, since diarrhea symptomatology in younger children tends to be more severe than in

older ones [25]. This observation needs further investigation to evaluate whether the delay in RVA diarrhea occurrence is a direct effect of the vaccine or due to other factors such as better access to general health services by vaccinated children.

A recent study from Mexico demonstrated a significant reduction in infant diarrhea mortality early after the introduction of the rotavirus vaccine [26]. Nonetheless, recent data from Brazil have demonstrated a decrease in RVA detection after the introduction of the vaccine, as well

Table 1 Occurrence acute diarrhea in children between February 2010 and February 2012, distributed by rotavirus A infection, vaccination status, and age range (months)

Age group	RVA positive			RVA negative			Total
	Vaccinated	Unvaccinated	Pos. Total	Vaccinated	Unvaccinated	Neg. Total	
00-06	3	13	16	35	83	118	134
07-12	13	12	25	80	56	136	161
13-18	9	10	19	56	28	84	103
19-24	8	9	17	45	29	74	91
>24	9	17	26	44	32	76	102
Total	42	61	103	260	228	488	591

Abbreviations: RVA, rotavirus A; Pos., positive; Neg., negative; Age ranges are shown in months

Table 2 Comparison of rotavirus A genotyping results from this study and those found by Costa et al. [12], whose data were collected prior to the availability of vaccination against rotavirus

Sampling period		G2[P4]	G1[P8]	G3[P8]	G4[P8]	G9[P8]	Total
2000-2002 ¹	N	12	36	4	2	0	54
	%	22.22 %	66.67 %	7.41 %	3.70 %	0.00 %	100.00 %
2010-2011 ²	N	2	1	0	0	49	52
	%	3.85 %	1.92 %	0.00 %	0.00 %	94.23 %	100.00 %
P-value, pairwise ³		p = 0.004	p < 0.001	p = 0.064	p = 0.257	p < 0.001	

The differences were statistically significant. The samples were collected in the same hospital and using the same methodology as in the present study

Abbreviations: N, observed number

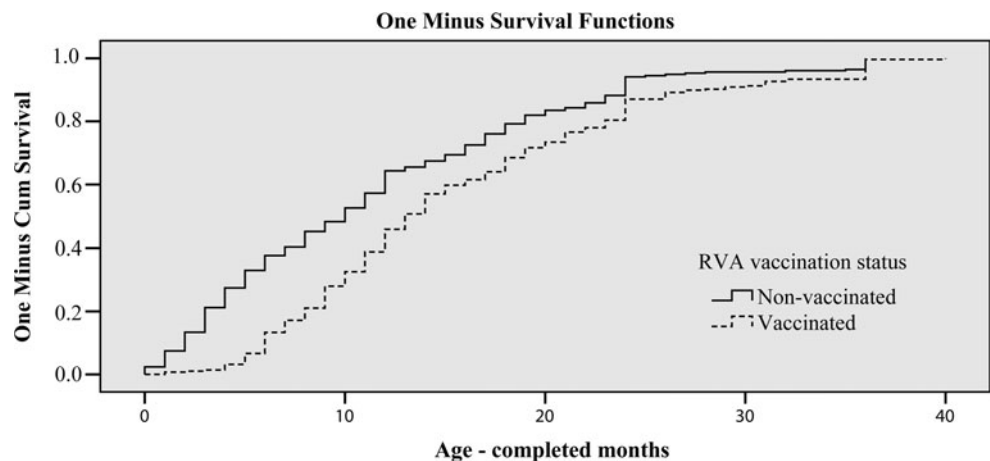
Collans G2[P4], G1[P8], G3[P8], G4[P8] and G9[P8] represent the observed rotavirus A genotypes found in each study G1[P4], G3[P4], G4[P4], G9[P4], G2[P8] genotypes were not detected

¹ Rotavirus A genotyping results from Costa et al. [12]

² Rotavirus A genotyping resultus from the present work

³ Pairwise comparison of genotype frequencies between studies using Fisher's exact test

Fig. 1 Survival analysis of the age of occurrence of diarrhea, limited to children up to 40 months old. Lines are grouped by RVA vaccination status. The y-axis shows the cumulative percent of the cases in each group. Diarrhea episodes occurred three to four months later in vaccinated children than in unvaccinated children (Mantel-Cox, log rank $X^2 = 20.8$, 1 d.f., $p < 0.000$)



as an important reduction in hospitalization of children with acute gastroenteritis caused by rotavirus [26].

The RVA rate observed at the beginning of this study agrees with data from other regions of the world, including Brazil. This is the first study done in Rondonia to evaluate the occurrence of viral gastroenteritis in children after the introduction of Rotarix® by the national immunization program in 2006.

Acknowledgments The authors would like to thank Glauciane Bifano for technical assistance, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico–CNPq, and Instituto de Pesquisa em Patologias Tropicais-IPEPATRO.

References

- Parashar UD, Hummelman EG, Bresee JS, Miller MA, Glass RI (2003) Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerg Infect Dis* 9:565–572
- Patton JT (2012) Rotavirus diversity and evolution in the post-vaccine world. *Discov Med* 13:85–97
- Parashar UD, Gibson CJ, Bresee JS, Glass RI (2006) Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerg Infect Dis* 12:304–306
- Dennehy PH (2005) Rotavirus vaccines: an update. *Curr Opin Pediatr* 17:88–92
- Lanzieri TM, Linhares AC, Costa I et al (2011) Impact of rotavirus vaccination on childhood deaths from diarrhea in Brazil. *Int J Infect Dis* 15:e206–e210
- Richardson V, Hernandez-Pichardo J, Quintanar-Solares M et al (2010) Effect of rotavirus vaccination on death from childhood diarrhea in Mexico. *N Engl J Med* 362:299–305
- Yen C, Tate JE, Patel MM et al (2011) Rotavirus vaccines: update on global impact and future priorities. *Hum Vaccin* 7:1282–1290
- Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156–159
- Pereira HG, Azeredo RS, Leite JP et al (1983) Comparison of polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), immuno-electron microscopy (IEM) and enzyme immunoassay (EIA) for the rapid diagnosis of rotavirus infection in children. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 78:483–490
- Gentsch JR, Glass RI, Woods P et al (1992) Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 30:1365–1373
- Das BK, Gentsch JR, Cicirello HG et al (1994) Characterization of rotavirus strains from newborns in New Delhi, India. *J Clin Microbiol* 32:1820–1822
- Costa MS, Nogueira PA, Magalhaes GF et al (2012) Rotavirus genotyping in gastroenteritis cases of an infantile population from Western Brazilian Amazonia. *Rev Soc Bras Med Trop* 45:520–522
- Vieira SC, Gurgel RQ, Kirby A et al (2011) Acute diarrhoea in a community cohort of children who received an oral rotavirus vaccine in Northeast Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 106:330–334
- Cardoso D, Soares CM, Dias e Souza MB et al (2003) Epidemiological features of rotavirus infection in Goiania, Goias, Brazil, from 1986 to 2000. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98:25–29
- Borges AM, Dias e Souza M, Fiaccadori FS, Cardoso D (2011) Monitoring the circulation of rotavirus among children after the introduction of the Rotarix vaccine in Goiania, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 106:499–501
- Gurgel RQ, Cuevas LE, Vieira SC et al (2007) Predominance of rotavirus P[4]G2 in a vaccinated population, Brazil. *Emerg Infect Dis* 13:1571–1573
- Domingues AL, Morais AT, Cruz RL, Moreira LP, Gouvea VS (2008) Rotavirus-associated infantile diarrhea in Uberaba, Minas Gerais, on the wake of the Brazilian vaccination program. *J Clin Virol* 43:298–301
- Carvalho-Costa FA, Araujo IT, de Santos Assis RM et al (2009) Rotavirus genotype distribution after vaccine introduction, Rio de Janeiro, Brazil. *Emerg Infect Dis* 15:95–97
- Safadi MA, Berezin EN, Munford V et al (2010) Hospital-based surveillance to evaluate the impact of rotavirus vaccination in Sao Paulo, Brazil. *Pediatr Infect Dis J* 29:1019–1022
- Munford V, Gilio AE, de Souza EC et al (2009) Rotavirus gastroenteritis in children in 4 regions in Brazil: a hospital-based surveillance study. *J Infect Dis* 1: S106–S113
- Kirkwood C, Bogdanovic-Sakran N, Barnes G, Bishop R (2004) Rotavirus serotype G9P[8] and acute gastroenteritis outbreak in children, Northern Australia. *Emerg Infect Dis* 10:1593–1600
- Santos N, Hoshino Y (2005) Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *Rev Med Virol* 15:29–56
- Gouvea VS, Dias GS, Aguiar EA et al (2009) Acute gastroenteritis in a pediatric hospital in rio de janeiro in pre- and post-rotavirus vaccination settings. *Open Virol* 3:26–30
- Salinas B, Perez Schael I, Linhares AC et al (2005) Evaluation of safety, immunogenicity and efficacy of an attenuated rotavirus vaccine, RIX4414: A randomized, placebo-controlled trial in Latin American infants. *Pediatr Infect Dis J* 24:807–816
- Ramig RF (2004) Pathogenesis of intestinal and systemic rotavirus infection. *J Virol* 78:10213–10220
- do Carmo GM, Yen C, Cortes J et al (2011) Decline in diarrhea mortality and admissions after routine childhood rotavirus immunization in Brazil: a time-series analysis. *PLoS Med* 8:e1001024