

Rocha, M.B., Gatti, M.S.V.

Universidade Estadual de Campinas – Instituto de Biologia
Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC)/CNPq

Palavras-chave: rotavírus - genotipagem NSP4 – humanos



Introdução

- Família Reoviridae, gênero Rotavirus. Vírus não envelopados, triplo capsídeo e genoma constituído por 11 segmentos de RNA dupla-fita (ds);
- Principal agente de gastroenterite em crianças em todo o mundo;
- Cerca de 2.500 crianças com menos de cinco anos de idade morrem por rotavírose por ano (Linhares, 2000);
- Genotipagem: baseada nas seqüências dos genes que codificam para as proteínas do capsídeo externo - VP7 (genótipo G) e VP4 (genótipo P) - por RT-PCR. Importante na proposição de vacinas contra esses vírus;
- Importante caracterizar outros genes de rotavírus para melhor entender sua circulação, restrição de hospedeiros e ocorrências de *genetic reassortments*;
- Para isso, foi introduzida a genotipagem para NSP4, uma proteína não estrutural de 22 aminoácidos, com função de enterotoxina;
- Existem até o momento, pelo menos seis genótipos diferentes de rotavírus para NSP4 (A-F) utilizando a técnica de *semi-nested* RT-PCR.

Objetivo

- Caracterizar amostras de rotavírus identificados em fezes de humanos já genotipados para G (VP7) e P (VP4) quanto aos genótipos A, B e C da NSP4, utilizando *semi-nested* RT-PCR

Metodologia

- Foram analisadas 30 amostras de fezes de humanos, todas positivas para rotavírus;
- A extração do dsRNA das amostras de fezes de humanos foi realizada com Trizol[®], segundo protocolo do fabricante;
- Reações de *semi-nested* RT-PCR segundo *Bányai, et al., 2009*, com modificações, foram realizadas para a caracterização dos genótipos A, B e C da NSP4 de rotavírus.

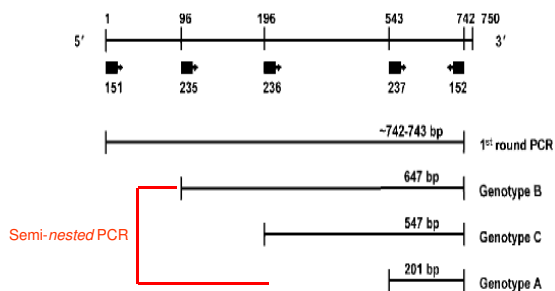


Figura 1: Localização dos iniciadores no gene da NSP4 de rotavírus, segmento 10, e tamanhos esperados dos segmentos amplificados. Os números acima do esquema, no gene da NSP4, indicam a posição de ligação dos iniciadores.

Resultados e discussão

- Na reação de transcriptase reversa, seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) e *semi-nested* PCR foram amplificadas regiões do segmento 10 de rotavírus (Figura 2);

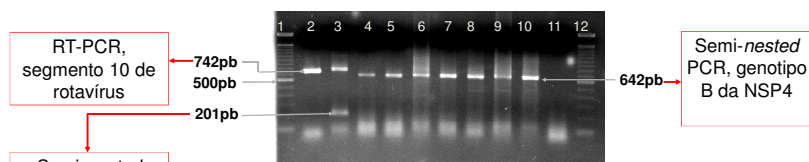


Figura 2: Gel de agarose a 1,5% para rotavírus humanos submetido a genotipagem da NSP4 pela reação de *semi-nested* RT-PCR. 1 e 12: padrão de peso molecular de 100pb; 2: SA11 positivo para RT-PCR; 3: SA11 positivo para genótipo A da NSP4 (201pb); 4-10: amostras de rotavírus positivas para genótipo B da NSP4 (642pb); 11: controle negativo (água com tratamento DEPC);

- 20 amostras foram caracterizadas como genótipo B e 10 não amplificaram para nenhum dos genótipos testados (Tabela 1).

Tabela 1: Genótipos NSP4 de amostras de rotavírus identificados em humanos da cidade de Campinas

Genótipos	NSP4				Total
	A	B	C	ND	
G1P[8]	-	3	ND	2	5
G3P[8]	-	4	ND	1	5
G4P[8]	-	2	ND	-	2
G5P[8]	-	1	ND	-	1
G9P[8]	-	5	ND	-	5
G1/G3P[8]	-	-	ND	1	1
G3P[4]	-	1	ND	1	2
G9P[4]	-	-	ND	2	2
ND	-	4	ND	3	7
Total		20		10	30

Conclusão

- Os genótipos A e C da NSP4 não foram detectados nas amostras de rotavírus testadas. Estudos sugerem a associação do genótipo A da NSP4 ao genótipo G2 (Araújo, 2007). Como não foram incluídas amostras G2 nesse estudo, faz-se necessário novos estudos com rotavírus G2 para determinar pela adequada implementação do teste;
- Os resultados deste trabalho demonstram ser o genótipo B da NSP4 o mais frequente dentre amostras de rotavírus humanos, levando em consideração os genótipos estudados no presente trabalho.

Referências

- Araújo, I.T., Heinemann, M.B., Mascarenhas, J. D. P. et al. Molecular analysis of the NSP4 and VP6 genes of rotavirus strains recovered from hospitalized children in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Medical Microbiology* 56: 854-859, 2007.
- Bányai, K., Bogdán, A., Szics, G. et al. Assignment of the group A rotavirus NSP4 gene into genotypes using a hemi-nested multiplex PCR assay: a rapid and reproducible assay for strain surveillance studies. *Journal of Medical Microbiology* 58: 303-311, 2009.
- Linhares, A. C. Epidemiologia das infecções por rotavírus no Brasil e os desafios para o seu controle. *Cad.Saude Pública* 16 (3):629-646, 2000.