ARTIGO ORIGINAL / *ORIGINAL ARTICLE*

Optimização de uma técnica de diagnóstico e genotipagem de rotavírus

Optimization of a rotavirus diagnostic and genotyping method

/ **L. A. Santos** / **H. Rebelo-de-Andrade**

Unidade de Vírus Respiratórios e Enterovírus do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, IP, Lisboa

Correspondência:

Professora Doutora Helena Rebelo-de-Andrade

Unidade de Vírus Respiratórios e Enterovírus, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, IP, Lisboa
Avenida Padre Cruz
1649-016 Lisboa, Portugal

Telefone: +351217526455
Fax: +351217526400
e-mail: H.Rebelo.Andrade@insa.min-saude.pt

/ Resumo

Introdução: Os rotavírus são o agente etiológico mais frequente das gastroenterites que ocorrem em crianças, sendo responsáveis, a nível mundial, por 111 milhões de episódios de diarreias/ano. A vacinação pode constituir uma nova oportunidade na prevenção da infecção por rotavírus. Sendo o número de genótipos elevado, existe a necessidade de monitorizar os genótipos circulantes no contexto da aplicação de novas vacinas.

Objectivos: Optimizar e implementar uma técnica de genotipagem de rotavírus.

Métodos: Foi optimizada e implementada uma técnica de genotipagem de rotavírus para a análise do genótipo P e para a análise do genótipo G, baseada em reacções de *nested* RT-PCR. A técnica optimizada foi aplicada para o diagnóstico e genotipagem de rotavírus em amostras fecais.

Resultados e Conclusão: A técnica de genotipagem desenvolvida permite utilizar as mesmas condições de reacção na análise do genótipo P e G. A optimização desta técnica permitiu que esta fosse executada em menos tempo e utilizando menor quantidade de reagentes. Na aplicação da técnica foi determinado o genótipo em todas as amostras analisadas.

Palavras-chave: Rotavírus, genotipagem, gastroenterites

/ Abstract

Introduction: Rotavirus is the most important etiologic agent of severe diarrheal disease in young children, being the cause of 111 million diarrheal episodes per year, worldwide. Vaccination may constitute a new opportunity for prevention of rotavirus infection and decrease the severity of gastroenteritis. As there are many rotavirus genotypes, it is important to monitor the circulation of the various genotypes in the context of introduction of new vaccines.

Objectives: Optimization and application of a genotyping method of rotavirus

Methods: A rotavirus genotyping method that includes the analysis of the P and G genotypes, based on nested RT-PCR reactions, was selected, optimized and applied on stool samples.

Results and Conclusion: The selected method provides one protocol that uses the same conditions for the P and G genotype analysis. The optimization of the method leads to a decrease in time to produce a result and also in reagents quantities. The application of the optimized method resulted in the identification of rotavirus genotypes from all virus positive samples analyzed.

Key-words: *Rotavirus, genotyping, gastroenteritis*

/ Introdução

Os rotavírus são o agente etiológico mais frequente das gastroenterites que ocorrem em crianças durante os seus primeiros anos de vida. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2004, foram estimadas aproximadamente 527 000 mortes devidas a infecções por rotavírus.[1]

Em Portugal, nas crianças com menos de cinco anos, os rotavírus são responsáveis anualmente por aproximadamente 66 565 episódios diarreicos, 16 641 consultas médicas e por 2 080 hospitalizações.[2]

Os rotavírus são vírus com genoma segmentado de dsRNA, sem invólucro, com estrutura icosaédrica e medem aproximadamente 70 nm de diâmetro.[3,4] A sua cápside apresenta três camadas: uma camada externa formada pelas proteínas VP4 (proteína clivada pela tripsina em VP5* e VP8*) e VP7 (glicoproteína), uma camada intermédia formada pela proteína VP6 e a camada mais interna, *core*, formada pelas proteínas VP1, VP2 e VP3.[5,6]

Os rotavírus do serogrupo A são designados em função de uma classificação binária que tem em conta o genótipo dado pela proteína VP7 (denominado G – glicoproteína) e o genótipo dado pela proteína VP4 (denominado P – sensível às proteases).[7,8,9]

A nível mundial e a nível europeu, a distribuição dos quatro genótipos predominantes, P[8]G1, P[4]G2, P[8]G3 e P[8]G4, é idêntica representando cerca de 90% das infecções por rotavírus.[8]

Nos últimos anos tem sido verificado um aumento da prevalência do genótipo P[8] G9 (desde a sua reintrodução no Homem em 1995), sendo este o genótipo predominante nalguns países como: Espanha, Bélgica, Brasil, Austrália e Tailândia.[10,11]

Muitos estudos mostraram que uma primeira infecção por rotavírus confere protecção contra estes vírus, reduzindo, consideravelmente, a gravidade de uma segunda infecção. Infecções posteriores vão estimulando progressivamente a resposta imunitária resultando muitas vezes em infecção assintomática.[12,13,14]

Neste trabalho é descrita a optimização e implementação de um método de genotipagem dos rotavírus que poderá ser aplicado ao diagnóstico de rotavírus e monitorização e avaliação dos genótipos predominantes a nível nacional. Esta abordagem reveste-se de particular interesse no contexto da introdução no mercado de novas vacinas contra as gastroenterites associadas a infecções por rotavírus.

/ Material e Métodos

A metodologia de genotipagem de rotavírus utilizada neste trabalho baseia-se no método utilizado por Gentesch (1992)[15] para a análise do genótipo P e no método utilizado por Gouvea (1990)[16] para a análise do genótipo G.

Os parâmetros utilizados foram uniformizados de forma a manter as mesmas condições de reacção para a análise de ambos os genótipos (P e G) com o objectivo de poderem ser analisados ao mesmo tempo, sob as mesmas condições e a partir de uma mesma suspensão do produto biológico.

Além da uniformização das condições de reacção de ambos os genótipos, sentiu-se a necessidade de proceder às seguintes alterações: (1) o primer utilizado para o genótipo P[8] (1T-1) foi substituído pelo primer descrito por Iturriza-Gomara (1998)[17] 1T-1D, e (2) a sequência de alguns dos primers foi modificada (Quadro I).

Foram preparadas suspensões da amostra fecal a 10% (p/v ou v/v) com PBS (Dulbecco (1x) w/o Ca^{2+}, Mg^{2+}, Biochrom AG), centrifugadas a 2000g durante 10 minutos. Do sobrenadante obtido foi feita uma extracção dos ácidos nucleicos com o kit comercial QIAamp® Viral RNA Mini Kit (Qiagen).

Como o genoma viral em estudo é dsRNA, foi necessário proceder a um passo de desnaturação. Concretamente, desnaturaram-se duas aliquotas constituídas por 5µl de eluído e por 3.5µl de DMSO (Merck, 99%) (uma para a análise do genótipo P, outra para a análise do genótipo G) a 97ºC durante 5 minutos, seguido de 5 minutos a 4ºC num termociclador iCycler™ Thermal Cycler (BioRad).

Após o passo de desnaturação foi adicionada aos tubos a mistura de reacção de RT-PCR, contendo 20mM de Tris-HCl e 50mM de KCl (obtidos com a utilização de 5µl de 10x PCR Buffer, minus Mg, Invitrogen), 1,5mM de $MgCl_2$ (Invitrogen), 2mM de cada dNTP (Roche), 1µM de cada *primer* (con2 e con3 na mistura de reacção para a análise do genótipo P e Beg-9 e RVG-9 na mistura de reacção para a análise do genótipo G) (Invitrogen), 7,5U de *Cloned* AMV-RT (15U/µl, Invitrogen), 2U de *Taq* polimerase (5U/µl) e 50U de RNasin® (40U/µl, Promega), para um volume total de 50 µl. Esta mistura foi submetida a uma etapa de transcrição reversa durante 30 minutos seguidos de 30 ciclos de PCR com um passo de desnaturação a 94ºC durante 1 minuto, uma etapa de hibridação a 50ºC durante 2 minutos e uma fase de extensão a 72ºC durante 2 minutos e, finalmente, um ciclo extra de extensão de 7 minutos a 72ºC.

Foram utilizados 5µl do produto da reacção de RT-PCR que serviram de template para um *nested*-PCR de genotipagem, onde se usou uma mistura de reacção contendo 20mM Tris-HCl, 50mM KCl (obtidos com 5µl de 10x PCR Buffer, minus Mg, Invitrogen), 1,5mM de $MgCl_2$ (Invitrogen), 2mM de cada dNTP (Roche), 0,5µM de cada *primer* (con3, 1T-1D, 2T-1, 3T-1, 4T-1 e 5T-1 na mistura de reacção para a análise do genótipo P e RVG-9, aAT8, aBT1, aCT2D, aDT4, aET3 e aFT9D na mistura de reacção para a análise do genótipo G) (Invitrogen) e 2,5U de *Taq* polimerase (5U/µl). Foi aplicado um ciclo de desnaturação de 5 minutos a 95ºC, seguido de 30 ciclos de PCR com uma etapa de desnaturação a 94ºC durante 1 minuto, uma de hibridação a 45ºC durante 2 minutos e uma de extensão a 72ºC durante 2 minutos. No final foi aplicado um ciclo extra de extensão de 5 minutos a 72ºC.

O produto das duas reacções de *nested*-PCR foi analisado por electroforese em gel

QUADRO I – *PRIMERS* UTILIZADOS NO MÉTODO SELECCIONADO.

Genótipo	Primer	Sentido	Fragmento (pb)	Sequência	Referência
Todos	Con3	*Forward*	-	TGG CTT CGC TCA TTT ATA GAC A	Modificado de Gentsch *et al.* (1992)
Todos	Con2	*Reverse*	-	ATT TCG GAC CAT TTA TAA CC	Gentsch *et al.* (1992)
P[4]	2T-1	*Reverse*	484	CTA TTG TTA GAG GTT AGA GTC	Gentsch *et al.* (1992)
P[6]	3T-1	*Reverse*	268	TGT TGA TTA GTT GGA TTC AA	Gentsch *et al.* (1992)
P[8]	1T-1D	*Reverse*	346	TCT ACT GGR TTR ACN TG	Iturriza-Gomara *et al.* (1990)
P[9]	4T-1	*Reverse*	392	TGA GAC ATG CAA TTG GAC	Gentsch *et al.* (1992)
P[10]	5T-1	*Reverse*	584	ATC ATA GTT AGT AGT CGG	Gentsch *et al.* (1992)
Todos	Beg-9	*Forward*	-	GGC TTT AAA AGA GAG AAT TTC CGT CTG G	Gouvea *et al.* (1990)
Todos	RVG9[§]	*Reverse*	-	GGT CAC ATC ATA CAA TTC T	Gouvea *et al.* (1990)
G1	aBT1	*Forward*	749	CAA GTA CTC AAA TCA ATG ATG G	Gouvea *et al.* (1990)
G2	aCT2D	*Forward*	652	CAA TGA TAT TAN NAC ATT TTC TNT G	Modificado de Gouvea *et al.* (1990)
G3	aET3	*Forward*	374	CGT TTG AAG AAG TTG CAA CAG	Gouvea *et al.* (1990)
G4	aDT4	*Forward*	583	CGT TTC TGG TGA GGA GTT G	Gouvea *et al.* (1990)
G8	aAT8	*Forward*	885	GTC ACA CCA TTT GTA AAT TCG	Gouvea *et al.* (1990)
G9	aFT9D	*Forward*	306	CTN GAT GTN ACT ACA ANT AC	Modificado de Gouvea *et al.* (1990)

[§] – *Primer* utilizado na reacção de RT-PCR em susbstituição do primer Beg-9 utilizado por Gouvea *et al.* (1990)
As bases alteradas em relação à bibliografia encontram-se destacadas

de agarose (Seakem) a 1,5% (p/v) em tampão 1x Tris-Borato-EDTA (10x TBE pH 8.3 buffer, Promega), a 80V durante 15-30 minutos, seguido-se de um período de 100-120 minutos a 120-150V.

Por fim, o gel foi corado com uma solução de Brometo de Etídio (Sigma) a 10mg/l durante 10-20 minutos e os produtos amplificados visualizados por aplicação de luz UV no equipamento de documentação digital Geldoc (BIORAD GelDoc™ XR).

Na técnica descrita foram optimizados os parâmetros: (1) tempo de hibridação; (2) tempo de extensão; (3) uso de DMSO na desnaturação; (4) número de ciclos das reacções de PCR; (5) quantidade de enzima AMV-RT; (6) quantidade de enzima *Taq* polimerase; (7) quantidade de *primers*; usando um controlo positivo obtido de uma amostra fecal com resultado positivo para rotavírus e de genótipo P[8]G1, confirmado por sequenciação automática.

O protocolo optimizado foi testado em 68 amostras fecais existentes no arquivo de produtos biológicos da Unidade de Vírus Respiratórios e Enterovírus, provenientes de infecções por rotavírus, 50 das quais foram colhidas no ano de 1997-1998 e 18 durante os anos de 2004 a 2007.

Nas quatro amostras em que o genótipo G não foi determinado pela reacção de *nested* RT-PCR, a genotipagem foi efectuada com recurso à sequência de nucleótidos. Esta sequência foi determinada por reacção de sequenciação cíclica num sequenciador automático de DNA (Applied Biosystems 3130XL Genetic Analyser) utilizando o kit de BigDye V.1.1 e os *primers* utilizados na reacção de RT-PCR.

/ Resultados

A análise do alinhamento das sequências dos *primers* usados com as sequências de várias estirpes de rotavírus revelou diferenças em algumas bases. Nos casos em que essas diferenças eram comuns a todas as estirpes analisadas, procedeu-se à alteração da base nucleotídica no *primer* pela base nucleotídica presente nas sequências. Nos casos em que esta diferença não era comum a todas as sequências analisadas procedeu-se à alteração da base nucleotídica do *primer* por uma base nucleotídica degenerada.

A optimização das condições do protocolo de genotipagem inicial conduziu a uma redução do tempo e da quantidade de reagentes utilizados nas reacções (Quadro II). As modificações foram incluídas

na metodologia, por tornarem o método mais rápido e mais económico na sua execução, mantendo ou aumentando a sensibilidade do mesmo.

A aplicação do protocolo optimizado para a análise do genótipo P e G dos rotavírus permitiu genotipar todas as amostras biológicas consideradas neste estudo no que diz respeito ao genótipo P. Em relação à análise do genótipo G foi possível determinar 94% dos genótipos (64 em 68 amostras fecais) (Quadro III). Nas restantes 4 amostras o genótipo foi determinado indirectamente por sequenciação automática de DNA com os *primers* utilizados no protocolo de genotipagem.

A caracterização do genótipo P foi possível nos 68 produtos biológicos colhidos a casos de infecções por rotavírus, tendo sido detectados os genótipos P[4], P[6] e P[8]. Na análise do genótipo G, o método seleccionado identificou os genótipos G1, G2, G3, G4 e G9 (figura 1).

QUADRO II – ALTERAÇÕES EFECTUADAS NA OPTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DAS REACÇÕES DO MÉTODO SELECCIONADO.

		Inicial	Optimizado
RT-PCR	*Primers*	1µM cada	0,25µM cada
	AMV-RT	7,5U	4,5U
	Nº Ciclos	30	25
	Tempo de extensão	2 minutos a 72ºC	1 minuto a 72ºC
2º PCR	*Primers*	0,5µM cada	0,375µM cada
	Taq Polimerase	2,5U	1,5U
	Tempo de extensão	2 minutos a 72ºC	1 minuto a 72ºC

QUADRO III – RESULTADO DA APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE *NESTED* RT-PCR PARA GENOTIPAGEM DAS AMOSTRAS CLÍNICAS.

	Genótipo P	Genótipo G
Amostras genotipadas	68 (100%)	64 (94%)
Amostras de genótipo indeterminado	0 (0%)	4 (6%)

/ Discussão

Um dos desenvolvimentos importantes desta técnica de genotipagem de rotavírus foi a adequação e actualização dos *primers* em função da evolução molecular destes vírus. Consequentemente, decidiu-se proceder às seguintes alterações: (1) substituição do *primer* utilizado para o genótipo P[8] (1T-1) pelo *primer* descrito por Iturriza-Gomara (1998)[17] 1T-1D, por este identificar estirpes P[8] não detectadas com o *primer* 1T-1; (2) substituição de bases ou introdução de bases degeneradas na sequência de alguns dos *primers*, por se verificar uma discrepância na sua sequência comparativamente com as sequências de estirpes mais recentes presentes na base de dados Genbank.

As bases degeneradas foram utilizadas sempre que nas estirpes analisadas a base nucleotídica diferia entre as várias sequências consideradas. Conseguiu-se, desta forma, assegurar a hibridação do *primer* com a maior parte das sequências conhecidas de rotavírus.

A optimização da técnica utilizada permitiu tornar o procedimento mais rápido na sua execução e mais económico como consequência da redução das quantidades dos reagentes que se encontravam em excesso.

Da análise dos dados associados a cada caso de gastroenterite de etiologia a rotavírus, verificou-se que a maioria dos casos ocorreram em crianças com idades entre os 7 e os 12 meses de idade, nas quais os episódios diarreicos tiveram uma duração de 2-6 dias, tal como se encontra descrito na literatura.[3]

A caracterização do genótipo P foi possível nos 68 produtos biológicos colhidos a casos de infecções por rotavírus. Associados a estes casos foram detectados os genótipos P[4], P[6] e P[8], sendo o último detectado em 93% (63) dos produtos biológicos analisados. Na análise do genótipo G, o método seleccionado identificou os genótipos G1, G2, G3, G4 e G9.

Neste estudo foram detectados os genótipos P[8]G1, P[8]G3, P[8]G4 e P[4]G2, todos em circulação a nível mundial.[8]

O genótipo P[8]G9 também foi detectado com alguma frequência, em oito das 68 infecções por rotavírus, duas das quais conjuntas com o genótipo P[8]G1. Embora não seja um genótipo predominante a nível mundial, a sua circulação tem aumentado nos últimos anos.[10,18]

De salientar o aparecimento neste estudo de uma infecção por rotavírus de genótipo pouco descrito, P[6]G2, sendo a sua incidência a nível europeu inferior a 1%.[8] No entanto, este genótipo tem uma maior prevalência no continente Africano[8] e, considerando o relacionamento próximo entre Portugal e vários países africanos de expressão portuguesa, a sua identificação foi considerada relevante.

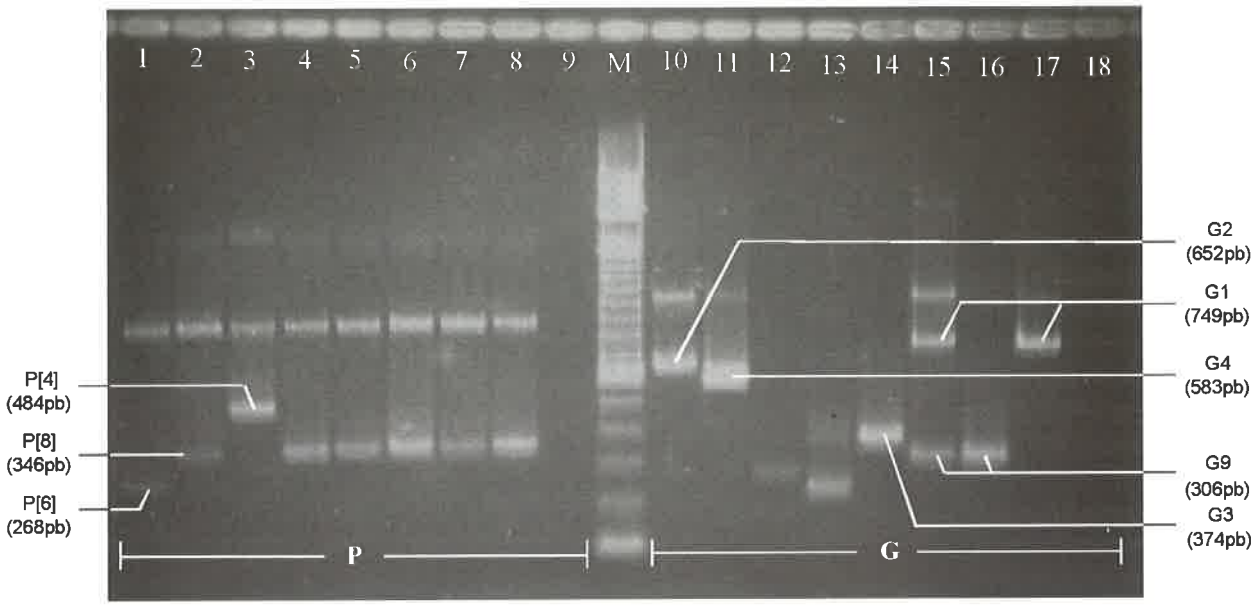

Figura 1 – Tamanho dos diferentes fragmentos obtidos em cada genótipo. Poço 1-9 – Determinação do genótipo P. Poço 10-18 – Determinação do genótipo G. Poço 1 – P[6] (268pb). Poço 2 – P[8] (346pb). Poço 3 – P[4] (484pb). Poço 4-8 – P[8] (346pb). Poço 9 – Controlo negativo. Poço 10 – G2 (652pb). Poço 11 – G4 (583pb). Poço 12 – Indeterminado (+-270pb). Poço 13 – Indeterminado (+-240pb e 370-400pb). Poço 14 – G3 (374pb). Poço 15 – Infecção mista por G1 e G9 (749pb e 306pb). Poço 16 – G9 (306pb). Poço 17 – G1 (749pb). Poço 18 – Controlo negativo. M – Marcador de pesos moleculares (100 pb).

/ Bibliografia

1. World Health Organization. Rotavirus vaccines. Wkly Epidemiol Rec. 2007; 82(32):285-95

2. Soriano-Gabarro M, Mrukowicz J, Vesikari T, Verstraeten T. "Burden of rotavirus disease in European Union countries". *Pediatr Infect Dis J.* 2006; 25(1 Suppl):S7-S11.

3. Kapikian AZ, Hoshino Y, Chanock RM. Rotaviruses. In *Fields Virology* 4th edition. Edited by: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, *et al.* Philadelphia, PA: Lippincott, Williams and Wilkins. 2001; 1787-1833

4. Wilhelmi I, Roman E, Sanchez-Fauquier A. "Viruses causing gastroenteritis". *Clin Microbiol Infect.* 2003; 9(4):247-62. Review.

5. Jayaram H, Estes MK, Prasad BV. "Emerging themes in rotavirus cell entry, genome organization, transcription and replication". *Virus Res.* 2004; 101(1):67-81. Review.

6. Maunula L, Von Bonsdorff CH. "Frequent reassortments may explain the genetic heterogeneity of rotaviruses: analysis of Finnish rotavirus strains". *J Virol.* 2002; 76(23):11793-800.

7. Estes M. Rotaviruses and Their Replication. In *Fields Virology* 4th edition. Edited by: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, *et al.*. Philadelphia, PA: Lippincott, Williams and Wilkins. 2001; 1747-1785

8. Santos N, Hoshino Y. "Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine". *Rev Med Virol.* 2005; 15(1):29-56. Review.

9. Cunliffe NA, Bresee JS, Hart CA. "Rotavirus vaccines: development, current issues and future prospects". *J Infect.* 2002; 45(1):1-9. Review.

10. Desselberger U, Wolleswinkel-van den Bosch J, Mrukowicz J, Rodrigo C, Giaquinto C, Vesikari T. "Rotavirus types in Europe and their significance for vaccination". *Pediatr Infect Dis J.* 2006; 25(1 Suppl):S30-41. Review.

11. Sanchez-Fauquier A, Montero V, Moreno S, Sole M, Colomina J, Iturriza-Gomara M, *et al.*. "Human rotavirus G9 and G3 as major cause of diarrhea in hospitalized children, Spain". *Emerg Infect Dis.* 2006; 12(10):1536-41.

12. Glass RI, Parashar UD, Bresee JS, Turcios R, Fischer TK, Widdowson MA, *et al.*. "Rotavirus vaccines: current prospects and future challenges". *Lancet.* 2006; 368(9532):323-32. Review.

13. Linhares AC, Bresee JS. "Rotavirus vaccines and vaccination in Latin America." *Rev Panam Salud Publica.* 2000; 8(5):305-31. Review.

14. Dennehy PH. "Rotavirus vaccines – an update". *Vaccine.* 2007; 25(16):3137-41. Review.

15. Gentsch JR, Glass RI, Woods P, Gouvea V, Gorziglia M, Flores J, *et al.*. "Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction". *J Clin Microbiol.* 1992; 30(6):1365-73.

16. Gouvea V, Glass RI, Woods P, Taniguchi K, Clark HF, Forrester B, *et al.*. "Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens". *J Clin Microbiol.* 1990; 28(2):276-82.

17. Iturriza-Gomara M, Green J, Brown DW, Desselberger U, Gray JJ. "Diversity within the VP4 gene of rotavirus P[8] strains: implications for reverse transcription-PCR genotyping". *J Clin Microbiol.* 2000; 38(2):898-901.

18. Feeney SA, Mitchell SJ, Mitchell F, Wyatt DE, Fairley D, McCaughey C, *et al.*. "Association of the G4 rotavirus genotype with gastroenteritis in adults". *J Med Virol.* 2006; 78(8):1119-23.