

Introdução:

<https://doi.org/10.20396/simtec.v7.2019.8745>

Norovírus (NoV) é um agente infeccioso de amplitude mundial, sendo o principal responsável por causar surtos de gastroenterites virais em crianças, idosos e indivíduos imunocomprometidos. Assim como em humanos, a infecção por NoV também ocorre em diversos modelos animais. Recentemente, o vírus foi identificado em ratos de laboratório (*Rattus norvegicus*), mas até o momento não há relatos do seu isolamento em cultura celular ou de metodologias para detecção deste vírus em amostras de ratos. Diante disso, este estudo tem por objetivo realizar o isolamento celular de NoV de colônias de ratos e implantar a técnica de diagnóstico molecular, semi-nested RT-PCR no Laboratório de Controle de Qualidade Sanitária e Animal (LCQSA) do CEMIB para monitoramento sanitário deste agente.

Metodologia:

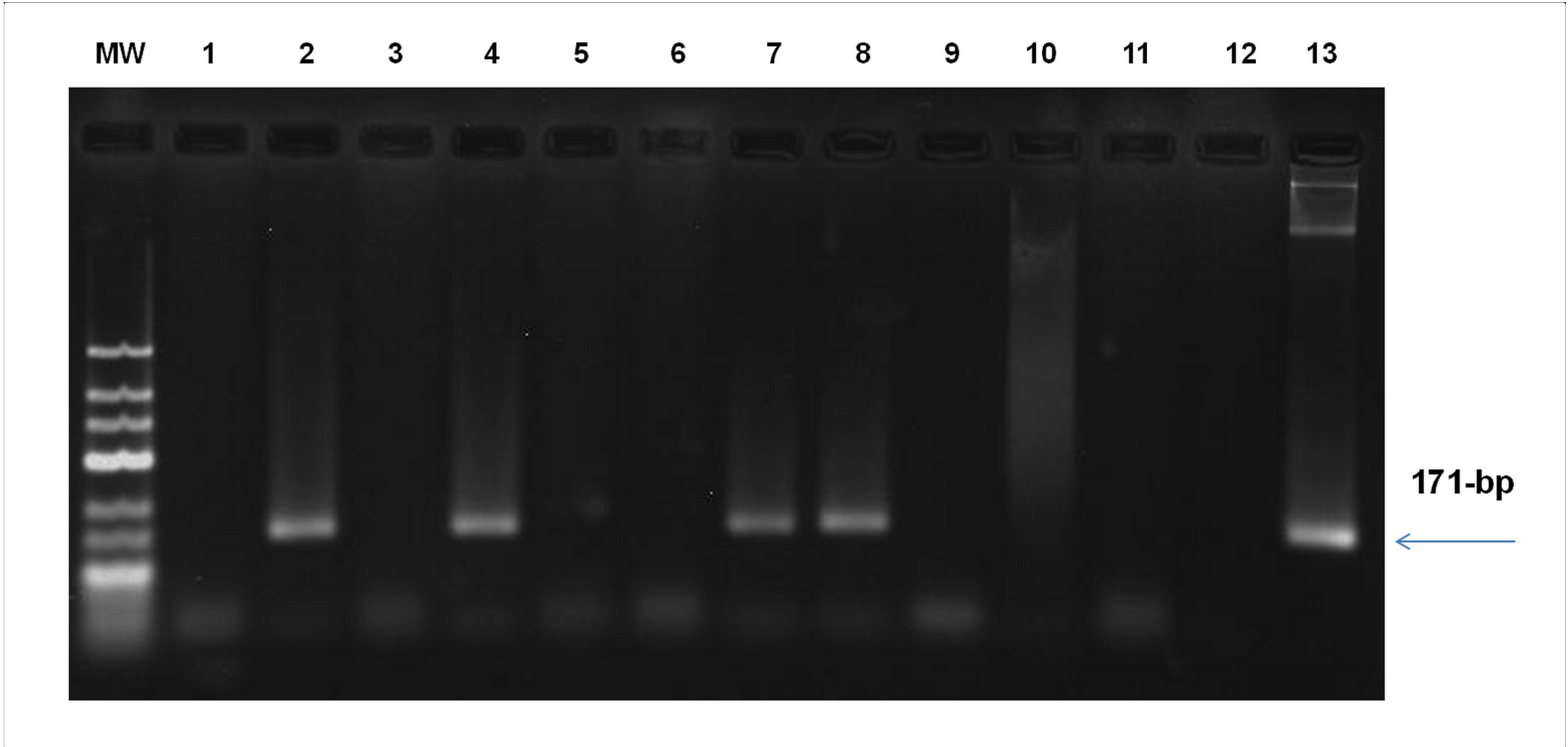
Para o isolamento do vírus foram utilizadas 13 amostras de fezes de rato. As suspensões de fezes obtidas foram inoculadas em células permissivas de macrófago RAW 264.7, até a observação de efeito citopático. A reação de semi-nested RT-PCR foi estabelecida com primers específicos para a (VP1) região conservada do capsídeo e utilizada para confirmação do isolamento viral e determinação da prevalência deste agente no Brasil. CEUA nº 2901-1.

Resultados:

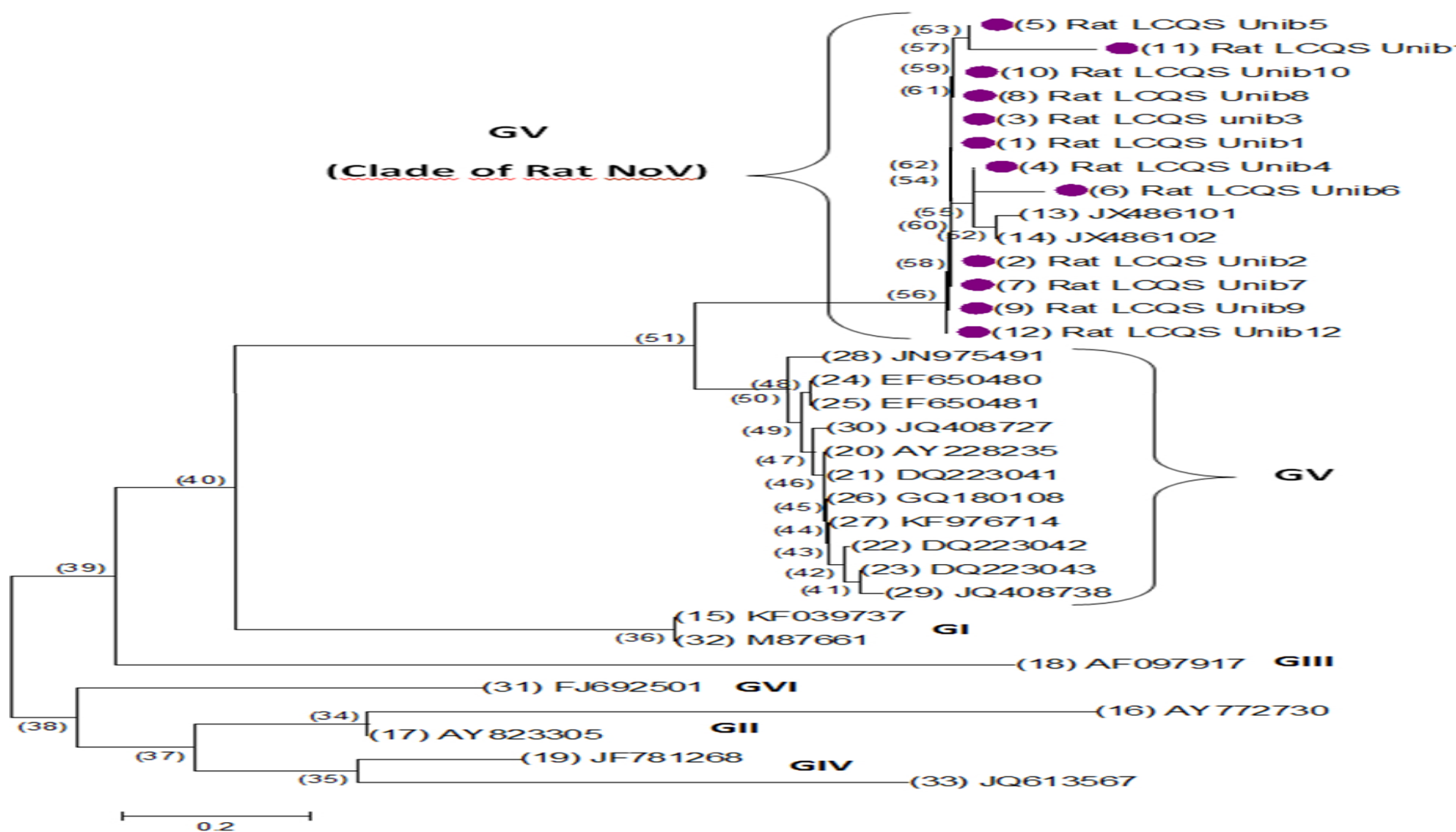
O isolamento do vírus foi confirmado pela reação estabelecida de semi-nested RT-PCR após a sétima passagem "cega" em células RAW 264.7. O produto amplificado obtido foi de 171pb (Fig 1). Para determinação da prevalência viral 108 amostras de fezes de 23 biotérios brasileiros (33% SPF e 67% convencionais) foram testadas. Destas, 12 (11%) apresentaram-se positivas para NoV de rato e identificadas como Rat LCQS Unib 1 a 12. Análises moleculares dos isolados virais demonstraram uma identidade de nucleotídeos de 98% com a mesma região das cepas padrão de rato (JX486101 e JX 486102) mantidas no GenBank. Uma árvore filogenética (Fig. 2) foi construída a partir do alinhamento das 12 sequencias obtidas e as cepas padrão dos genogrupos de Norovírus (GI ao GVI), utilizando neighbor-joining method (1.000 replicas) e o software MEGA. Desta forma, foi possível observar que o NoV de rato obtido por nossa equipe permaneceu no mesmo genogrupo das cepas de camundongo, porém em um clado separado. Isso nos leva a sugerir que NoV de rato deve compreender um novo subgrupo dentro genogrupo V. Este trabalho resultou no depósito da primeira cepa brasileira de NoV de rato no GenBank (KU169124), bem como o estabelecimento de uma metodologia de diagnóstico para norovírus.

Considerações finais:

Este é o primeiro relato do desenvolvimento de um semi-nested RT-PCR para identificação de NoV em ratos de laboratório (*Rattus norvegicus*). A implantação desta metodologia auxiliou no estabelecimento de um programa de monitoramento sanitário no Laboratório de Controle de Qualidade Sanitária e Animal do CEMIB/UNICAMP, e na determinação da prevalência deste vírus nas colônias de rato de biotérios brasileiros.



Rat NoV: Gel de agarose 2% corado com GelRed. Produto amplificado de 171pb. Linhas de 1-11: amostras teste. Linha 12: controle negativo (Água DEPC). Linha 13: Controle positivo de NoV de rato (plasmídeo)



Árvore filogenética NoV: 132 nucleotídeos da região VP1 dos genogrupos de norovírus (GI a GVI) e os amplificados Rat LCQS Unib 1 a 12. A árvore foi construída utilizando neighbor joining method (1.000 replicas) MEGA software.

Referências: - Rodrigues DM, Moreira JCO, Lancellotti M, Gilioli R, Corat MAF. Murine Norovirus infection in brazilian animal facilities. Exp Anim. 2017 May 3;66 (2):115-124. - Moreira, J.C.O., Rodrigues, D.M., Gilioli, R., Costa, F.F. and Albuquerque, D.M..2018. Semi-nested RT-PCR Assay for Detection of Norovirus in Rat Fecal Samples. Exp. Anim. - Tse, H., Chan, W.M., Lam, C.S., Lau, S.K., Woo, P.C. and Yuen, K.Y. 2012. Complete genome sequences of novel rat noroviruses in Hong Kong. J. Virol. 86: 12435-12436. -Tsunesumi, N., Sato, G., Iwasa, M., Kabeya, H., Maruyama, S. and Tohya, Y. 2012. Novel murine norovirus-like genes in wild rodents in Japan. J. Vet. Med. Sci. 74: 1221-1224.

Agradecimentos: Aos colegas do Laboratório de Controle de Qualidade Sanitária e Animal Do Cemib/Unicamp: Clarice, Euma, Robson, Silvio e Jhenifer e à equipe do Laboratório de Hematologia e Hemoterapia do Hemocentro/Unicamp pelo apoio técnico.