

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA- UNESP  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIÓLOGICA DE ROTAVÍRUS  
BOVINO DOS ESTADOS DE MINAS GERAIS, GOIÁS E MATO  
GROSSO DO SUL, NO PERÍODO DE 2006 A 2010**

**Heloisa Pinto de Godoy Siqueira  
Médica Veterinária**

**2019**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DE ROTAVÍRUS  
BOVINO DOS ESTADOS DE MINAS GERAIS, GOIÁS E MATO  
GROSSO DO SUL, NO PERÍODO DE 2006 A 2010**

**Discente: Heloisa Pinto de Godoy Siqueira**

**Orientadora: Profa. Dra. Maria da Gloria Buzinaro**

**Coorientadora: Profa. Dra. Ingrid Bortolin Affonso Lux Hoppe**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp. Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutora em Medicina Veterinária (Medicina Veterinária Preventiva)

S618c Siqueira, Heloisa Pinto de Godoy  
Caracterização epidemiológica de rotavírus bovino dos Estados de Minas Gerais, Goiás e Mato Grosso do Sul, no período de 2006 a 2010. / Heloisa Pinto de Godoy Siqueira. -- Jaboticabal, 2018  
53 p. : tabs., fotos, mapas

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal  
Orientadora: Maria da Gloria Buzinaro  
Coorientadora: Ingrid Bortolin Affonso Lux Hoppe

1. Diarreia. 2. PAGE. 3. Rotavíruses. 4. RT-PCR. 5. Brasil. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

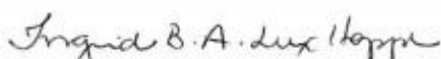
**TÍTULO DA TESE:** CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DE ROTAVÍRUS BOVINO DOS ESTADOS DE MINAS GERAIS, GOIÁS E MATO GROSSO DO SUL, NO PERÍODO DE 2006 A 2010

**AUTORA:** HELOISA PINTO DE GODOY SIQUEIRA

**ORIENTADORA:** MARIA DA GLORIA BUZINARO

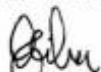
**COORIENTADORA:** INGRID BORTOLIN AFFONSO LUX HOPPE

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em MEDICINA VETERINÁRIA, área: Medicina Veterinária Preventiva pela Comissão Examinadora:



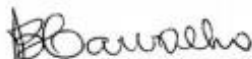
Pós-doutoranda INGRID BORTOLIN AFFONSO LUX HOPPE

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal



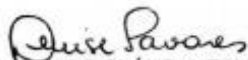
Dra. DANIELA GOMES DA SILVA

Médica Veterinária Autônoma / Jaboticabal/SP



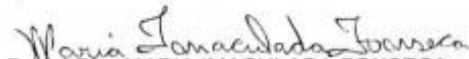
Profa. Dra. ADOLORATA APARECIDA BIANCO CARVALHO

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Câmpus de Jaboticabal/Unesp



Profa. Dra. DENISE CLÁUDIA TAVARES

Universidade Paulista-Unip / Bauru/SP



Profa. Dra. MARIA IMACULADA FONSECA

Departamento de Economia, Administração e Educação / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 19 de novembro de 2018

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

HELOISA PINTO DE GODOY SIQUEIRA - nascida em 07 de junho de 1985, na Cidade de Cuiabá, Mato Grosso, filha de Nicolau Pinto de Godoy Filho e Amélia Maria Sá de Godoy. Ingressou em junho de 2006 no Curso de Medicina Veterinária na Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), concluindo-o em dezembro de 2010. No primeiro semestre de 2011 foi bolsista de treinamento técnico científico do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), trabalhando com produção de gás in vitro para pequenos ruminantes, na mesma universidade de sua graduação. No ano seguinte se mudou para Jaboticabal e continuou como bolsista de treinamento técnico, concedida desta vez pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), para trabalhar com análises e avaliações bromatológicas na produção animal. Em março de 2013 iniciou o Curso de Mestrado em Medicina Veterinária, área de concentração em Medicina Veterinária Preventiva, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal (FCAV/Unesp), com dissertação intitulada “Epidemiologia molecular de rotavírus em rebanhos bovinos no Estado de São Paulo, no período de 2006 a 2010”, defendida em fevereiro de 2015. No mesmo ano ingressou no curso de doutorado da mesma instituição, com término em novembro de 2018.

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor,  
mas lutei para que o melhor fosse feito.  
Não sou o que deveria ser,  
mas Graças a Deus, não sou o que era antes”*

*Marthin Luther King*

## DEDICATÓRIA

*Assim como a minha dissertação, dedico esta tese à minha mãe Amélia Maria Sá de Godoy, por ser meu porto seguro, uma pessoa guerreira, que mesmo sem ter tido a oportunidade de estudar, sempre me incentivou e nunca me deixou desistir de tentar, sempre com muita força, perseverança em todos os momentos e muito orgulho de tudo isso!!*

*Ao meu pai Nicolau Pinto de Godoy Filho, um pouco rigoroso, mas com muito amor para dar, que sempre fez minhas vontades, desde levantar de madrugada para pegar um simples copo de água, como fazer “aquelas” super “gororobas” para sua filha faminta.*

*Ao meu maridinho André Buzutti de Siqueira, meu suporte em todos os momentos difíceis desses sete anos, meu amigo, meu psicólogo e meu maior motivador.*

*Graças a vocês sou tudo o que posso ser hoje!!!*

## AGRADECIMENTOS

*Agradeço a Deus por estar presente em minha vida, pois a fé é maior do que os nossos medos, e a nossa determinação maior do que qualquer obstáculo.*

*À minha querida professora e orientadora Dr<sup>a</sup> Maria da Gloria Buzinaro, por me permitir fazer o curso de doutorado, ter acreditado em mim, e sempre me dando muitos ensinamentos. Sou muita grata pela confiança, pela paciência e toda sabedoria.*

*À minha coorientadora Dr<sup>a</sup> Ingrid Bortolin Affonso Lux Hoppe por toda sua paciência, tempo dedicado e disposição.*

*À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Adolorata Aparecida Bianco Carvalho pela correção deste trabalho na qualificação, pelos ensinamentos em sala de aula, pelas conversas e conselhos nos corredores do departamento, por sempre estar presente com um abraço gratificante.*

*Ao Prof<sup>o</sup> Samir Issa Samara pelos ensinamentos durante toda a minha pós-graduação.*

*Ao Prof<sup>o</sup> Luís Antônio Mathias por sua sabedoria e conhecimentos transmitidos, que os levo para o resto de minha vida.*

*Ao Prof<sup>o</sup> Luiz Francisco Prata por ter dado a oportunidade de um casal vindo de Mato Grosso poder estudar na Unesp, onde tudo se iniciou.*

*À Prof<sup>a</sup> Maria Imaculada Fonseca pelas sugestões na banca de qualificação e também na defesa deste trabalho.*

*À Dr<sup>a</sup> Daniela Gomes por sempre estar disposta a participar das minhas qualificações e defesas.*

*À Prof<sup>a</sup> Denise Tavares por aceitar participar desta banca, e pela amizade desde o mestrado.*

*Aos professores do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva por todo o ensinamento em suas disciplinas e conversas pelos corredores.*

*Aos funcionários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva pelo acolhimento: Diba, Andréa, Márcia, Zé, Roseane, Assis, Cidinha e Marisa.*

*Aos meus amigos que fiz em Jabuka City, Gislaine Raquel, Renata Ferreira, Thyago Augusto e Antônia.*



*À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por ter me concedido bolsa de estudo.*

*Aos meus pais Nicolau e Amélia por todo amor, compreensão e por sempre me incentivar a estudar.*

*Ao meu irmão Paulo e minha cunhada Débora por serem presentes em minha vida, por almejarem o meu sucesso e estarem sempre me envolvendo com o seu amor.*

*À minha irmã Fernanda por sempre acreditar em mim com muito amor, me estimular a vestir roupas melhores e me dar muitas bolsas 😊!!!*

*Aos bebezinhos da minha vida que agora já são rapazes: Bruno Fernando, Luiz Felipe e André Fernando. Amo-os infinitamente.*

*Aos amigos de Boa Vista Roraima, Everton e Fabiola.*

*E ao meu maridinho por TUDO!!*

*Agradeço imensamente a todos que contribuíram diretamente ou indiretamente na minha formação pessoal e acadêmica, vocês foram fundamentais.*

*O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001*

*"This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001"*

*Muito obrigada!!!!*

## Sumário

<b>RESUMO.....</b>	<b>iv</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>v</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>vi</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>vii</b>
<b>LISTA DE QUADROS.....</b>	<b>viii</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>3</b>
2.1 GASTROENTERITES EM ANIMAIS DE PRODUÇÃO .....	3
2.2 CARACTERÍSTICAS GERAIS DE ROTAVÍRUS .....	4
2.3 PATOGENIA .....	6
2.4 DIAGNÓSTICO .....	7
2.5 PREVENÇÃO E CONTROLE DA ROTAVIROSE BOVINA .....	8
2.6 EPIDEMIOLOGIA DAS ROTAVIROSES EM BOVINOS .....	9
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>13</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	13
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	13
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>14</b>
4.1 ÁREA DE ESTUDO .....	14
4.2 ANÁLISE DA PRESENÇA DE ROTAVÍRUS PELA TÉCNICA DE PAGE .....	17
<b>4.2.1 Preparação das suspensões fecais .....</b>	<b>17</b>
<b>4.2.2 Extração de RNA, preparo e coloração do gel de poliacrilamida .....</b>	<b>18</b>
4.3 ANÁLISE DO PERFIL ELETROFORÉTICO .....	18
4.4 GENOTIPAGEM DAS AMOSTRAS POSITIVAS PELA RT-PCR.....	19
<b>4.4.1 Extração do RNA de rotavírus bovino .....</b>	<b>19</b>
<b>4.4.2 Síntese do DNA complementar (cDNA) e PCR .....</b>	<b>20</b>
<b>4.4.3 Multiplex “semi-nested” PCR .....</b>	<b>21</b>
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	22
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>23</b>

5.1 DETECÇÃO DA INFECÇÃO POR ROTAVÍRUS PELA PAGE .....	23
<b>5.1.1 Ocorrência de rotavírus no Estado de Minas Gerais .....</b>	<b>25</b>
<b>5.1.2 Ocorrência de rotavírus no Estado de Goiás .....</b>	<b>27</b>
<b>5.1.3 Ocorrência de rotavírus no Estado de Mato Grosso do Sul .....</b>	<b>29</b>
5.2 INFLUÊNCIA DA IDADE NOS CASOS POSITIVOS DE ROTAVÍRUS.....	30
5.3 DISTRIBUIÇÃO TEMPORAL DE CASOS POSITIVOS DE ROTAVÍRUS .....	33
<b>5.4 ANÁLISE DO PERFIL ELETROFORÉTICO DAS ESTIRPES DE     ROTAVÍRUS.....</b>	<b>35</b>
5.5 CARACTERIZAÇÃO DOS GENOTIPOS G E P DE ROTAVÍRUS.....	38
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>41</b>
<b>7. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>42</b>

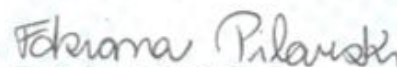
**CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

**CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "Ocorrência de rotavirus bovino nos Estados de Minas Gerais, Goiás e Mato Grosso do Sul no período de 2006 a 2010", protocolo nº 008831/18, sob a responsabilidade da Profª Drª Maria da Glória Buzinaro, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 06 de agosto de 2018.

Vigência do Projeto	03/07/2015 a 03/05/2018
Espécie / Linhagem	Bovinos
Nº de animais	851
Peso / Idade	Até 90 dias
Sexo	Ambos os sexos
Origem	Propriedades rurais

Jaboticabal, 06 de agosto de 2018.

  
**Profª Drª Fabiana Pilarski**  
Coordenadora – CEUA

## **CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DE ROTAVÍRUS BOVINO DOS ESTADOS DE MINAS GERAIS, GOIÁS E MATO GROSSO DO SUL NO PERÍODO DE 2006 A 2010**

**RESUMO** - A diarreia neonatal em bovinos é muito comum e resulta em importantes perdas econômicas. O rotavírus constitui um dos principais agentes relacionado à síndrome diarreica, que pode acometer também seres humanos. A ocorrência de rotavírus em bovinos leiteiros e de corte dos Estados de Minas Gerais, Goiás e Mato Grosso do Sul foi analisada por meio de dados epidemiológicos obtidos no período de 2006 a 2010, do Laboratório de Rotavírus, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV/Unesp) de Jaboticabal, São Paulo. No período estudado, foram obtidas 851 amostras de fezes de bezerros, na faixa etária de um a 90 dias de idade, independentemente da manifestação de sinal clínico de diarreia. As amostras foram provenientes de 47 rebanhos leiteiros e 30 rebanhos de corte. A análise foi feita pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) que indicou animais positivos em 29,9% (23/77) dos rebanhos e 7,1% (60/851) das amostras. Maior prevalência de animais positivos foi encontrada em amostras de bezerros de corte, com 12% (45/370). Dos casos de diarreia, 22,6% (45/199) dos bezerros foram positivos, enquanto 2,3% (15/642) foram detectados em bezerros sem diarreia. O Estado de Goiás apresentou maior prevalência de animais positivos (11,7%, 33/282), seguido por Mato Grosso do Sul (6,5%, 17/260) e Minas Gerais (3,2%, 10/309). A frequência da infecção por rotavírus foi maior em bezerros com idade inferior a 30 dias e nos meses mais chuvosos do ano. De acordo com a migração do genoma do rotavírus na PAGE foi possível identificar quatro perfis eletroforéticos distintos, característicos de rotavírus do grupo A, mostrando diferenças entre as estirpes de campo. A caracterização de amostras pela reação em cadeia da polimerase precedida de transcrição reversa (RT-PCR) detectou a presença dos genótipos G6P[5] e G6P[11] relacionados à rotavírose em bovinos. A presença da infecção por rotavírus nas regiões estudadas ressalta a importância de medidas de controle e prevenção da enfermidade, uma vez que o agente está em constante circulação nos rebanhos bovinos brasileiros.

**Palavras-chave:** Diarreia, PAGE, Rotavírus, RT-PCR

## **EPIDEMIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF BOVINE ROTAVIRUS FROM THE STATES OF MINAS GERAIS, GOIÁS AND MATO GROSSO DO SUL FROM 2006 TO 2010**

**ABSTRACT-** Rotavirus is one of the main agents related to the syndrome, which can also affect humans. The occurrence of rotavirus in dairy and beef cattle from Minas Gerais, Goiás and Mato Grosso do Sul was analyzed by epidemiological data obtained from 2006 to 2010, from the Rotavirus Laboratory at FCAV / Unesp from Jaboticabal, São Paulo. During the study period, 851 faecal samples were obtained from calves, ranging from 1 to 90 days old, regardless of clinical signs of diarrhea. Samples were obtained from 47 dairy and 30 beef cattle. Analysis by the polyacrylamide gel electrophoresis technique (PAGE) indicated positive animals in 29.9% (23/77) of the herds and 7.1% (60/851) of the samples. Higher prevalence was found in samples of beef calves, with 12% (45/370) of positive animals. The cases with diarrhea, 22.6% (45/199) of the calves were positive, while 2.3% (15/642) were detected in calves without diarrhea. Goiás state had a higher prevalence of positive animals (11.7%, 33/282), followed by Mato Grosso do Sul (6.5%, 17/260) and Minas Gerais (3.2%, 10/309). The frequency of rotavirus infection was higher in calves under 30 days old in the rainiest months of the year. According to the migration of the rotavirus genome in PAGE it was possible to identify four distinct electrophoretic profiles, characteristic of Group A Rotavirus, showing differences between the field strains. The characterization of samples by the polymerase chain reaction preceded by reverse transcription (RT-PCR) detected the presence of G6P[5] and G6P[11] genotypes related to rotavirus in cattle. The presence of rotavirus infection in the studied regions underscores the importance control of diseases and prevention measures, since the agent is constantly circulating in Brazilian cattle herds.

**Keywords:** Diarrhea, PAGE, Rotaviruses, RT-PCR

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Resultados gerais, de acordo com o tipo de exploração e consistência das fezes, da técnica de PAGE, para detecção de rotavírus em bezerros dos Estados de Minas Gerais, Goiás e Mato Grosso do Sul, no período de 2006 a 2010 .....	23
<b>Tabela 2.</b> Resultados da técnica de PAGE para detecção de rotavírus, de acordo com a consistência das fezes, em bezerros dos Estados de Minas Gerais, Goiás e Mato Grosso do Sul, no período de 2006 a 2010.....	25
<b>Tabela 3.</b> Resultados da técnica de PAGE para detecção de rotavírus em bezerros do Estado de Minas Gerais no período de 2006 a 2010. ....	26
<b>Tabela 4.</b> Resultados da técnica de PAGE para detecção de rotavírus em bezerros do Estado de Goiás no período de 2006 a 2010. ....	27
<b>Tabela 5.</b> Resultados da técnica de PAGE para detecção de rotavírus em bezerros do Estado de Mato Grosso do Sul no período de 2006 a 2010.....	29
<b>Tabela 6.</b> Distribuição das amostras de fezes positivas para rotavírus pela técnica de PAGE de acordo com a faixa etária dos bezerros, em rebanhos leiteiros e de corte, dos Estados de Minas Gerais, Goiás e Mato Grosso do Sul, no período de 2006 a 2010. ....	31
<b>Tabela 7.</b> Distribuição temporal da colheita das amostras de fezes e dos casos positivos de rotavírus em bezerros de rebanhos bovinos leiteiros e de corte, provenientes dos Estados de Minas Gerais, Goiás e Mato Grosso do Sul, no período de 2006 a 2010 .....	33
<b>Tabela 8.</b> Perfis eletroforéticos de rotavírus bovino em amostras de fezes de bezerros com um a 90 dias de idade dos Estados de Minas Gerais, Goiás e Mato Grosso do Sul, de acordo com o tipo do rebanho e o município de origem, no período de 2006 a 2010.....	35
<b>Tabela 9.</b> Resultados da genotipagem de rotavírus pela técnica de RT-PCR em amostras de bezerros dos Estados de Minas Gerais, Goiás e Mato Grosso do Sul, no período de 2006 a 2010. ....	39

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Quantidade de amostras de fezes de bezerros colhidas de acordo com o estado da federação de procedência, no período de 2006 a 2010. .... 15
- Figura 2.** Mapa da localização geográfica dos municípios do Estado de Minas Gerais (A), municípios do Estado de Goiás (B), e municípios do Estado de Mato Grosso do Sul (C), onde encontravam-se os rebanhos estudados, entre 2006 e 2010. .... 16
- Figura 3.** Mapa do Estado de Minas Gerais destacando os municípios onde foram encontrados bezerros positivos para rotavírus, entre 2006 e 2010. .... 26
- Figura 4.** Mapa do Estado de Goiás destacando os municípios onde foram encontrados bezerros positivos para rotavírus, entre 2006 e 2010. .... 28
- Figura 5.** Mapa do Estado de Mato Grosso do Sul destacando os municípios onde foram encontrados bezerros positivos para rotavírus, entre 2006 e 2010. .... 30
- Figura 6.** Distribuição temporal do número de amostras de fezes colhidas e de casos positivos de rotavírus em bezerros leiteiros e de corte dos Estados de Minas Gerais, Goiás e Mato Grosso do Sul, no período de 2006 a 2010. .... 34
- Figura 7.** Perfil eletroforético do genoma de rotavírus do grupo A detectado em bezerros de rebanhos de corte do Estado de Mato Grosso do Sul, em comparação com a amostra padrão NCDV. Perfil de amostras classificadas como eletroferótipo H. .... 37
- Figura 8.** Perfil eletroforético do genoma de rotavírus do grupo A detectados em bezerros de rebanhos de corte no Estado de Goiás. 1. Linhas 1 a 5 estirpes de rotavírus com o mesmo perfil do genoma (perfil E), e amostra padrão NCDV. .... 38



## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1.</b> Características e funções das proteínas codificadas pelo RNA segmentado dos <i>Rotavirus</i> .....	5
<b>Quadro 2.</b> Sequência de bases dos “primers” utilizados para a genotipagem G e P de rotavírus bovino, sua posição no genoma, tamanho do segmento esperado e referências.....	20

## 1. INTRODUÇÃO

A cadeia produtiva de bovinos no Brasil é um setor importante do agronegócio e exerce reflexo direto na economia nacional. Apesar de possuir um dos maiores rebanhos do mundo, a produtividade dos rebanhos brasileiros é considerada baixa. O manejo sanitário deficiente é um dos fatores responsáveis pelo mau desempenho da atividade leiteira e de corte, possibilitando a ocorrência de surtos de enfermidades que acarretam elevados prejuízos econômicos.

A diarreia neonatal é uma das doenças mais frequentes dos bezerros e a principal causa de perdas econômicas devido à alta morbidade e mortalidade. Caracterizada como uma síndrome complexa, a doença é desencadeada pela interação de vários fatores, entre os quais estão a imunidade, a genética, o ambiente, a nutrição e a infecção por microrganismos patogênicos. Os agentes envolvidos nessa síndrome podem ser de origem bacteriana, parasitária e viral, isolados ou em associação, muitos dos quais com potencial zoonótico. Dentre os agentes de origem viral, o rotavírus assume papel importante, apresentando como característica marcante a alta resistência da partícula viral no ambiente, facilidade de transmissão entre animais infectados, grande diversidade genética das amostras de campo, além da capacidade de infectar uma grande diversidade de hospedeiros, dificultando o controle da enfermidade e, ainda, com consequências na saúde pública.

Em todo o mundo, casos de diarreias em bezerros tem como causa principal o rotavírus do grupo A, com maior frequência de diagnóstico em animais até 30 dias de idade. No Brasil, as pesquisas também apontam o rotavírus como agente importante de diarreias em bezerros, com relatos em rebanhos bovinos de diversos estados.

Devido à importância do agente e seu diagnóstico frequente em casos de diarreias, a continuidade de estudos epidemiológicos são imprescindíveis para melhor compreensão dos fatores envolvidos na infecção e manutenção do agente

etiológico nos rebanhos bovinos brasileiros, para que sejam tomadas medidas adequadas de prevenção e controle da enfermidade.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 GASTROENTERITES EM ANIMAIS DE PRODUÇÃO

O Brasil é o maior exportador de carne bovina do mundo e esta atividade econômica representa uma das mais importantes para a economia nacional. Em 2016, a atividade registrou receita de US\$ 5,3 bilhões de dólares, no qual participaram como maiores produtores de bovinos os Estados de Mato Grosso, Minas Gerais, Goiás e Mato Grosso do Sul (IBGE, 2017).

Historicamente, a produção de bovinos no Brasil apresenta uma série de deficiências que reduzem a sua produtividade e rentabilidade apesar dos elevados índices produtivos. Entre essas deficiências, destacam-se as diarreias, acometendo principalmente animais jovens com idade até 30 dias de vida (Jerez et al., 2002).

A diarreia se caracteriza por grande perda de líquidos e eletrólitos corporais, causando desidratação, que dependendo do grau, pode levar à perda de peso, choque hipovolêmico e evoluir até a morte do animal (Abe et al., 2011). As consequências mais frequentes dos episódios de diarreia neonatal bovina são os aumentos significativos nas taxas de morbidade e mortalidade, maior suscetibilidade a outras infecções, particularmente as respiratórias, despesas adicionais com o tratamento dos animais acometidos, redução na conversão alimentar e atraso no crescimento (Paul e Lyoo, 1993). Estudos recentes continuam mostrando que a diarreia é a principal causa de mortalidade de bezerros nos primeiros meses de vida (Azzadeh, 2011; Torsein et al., 2011; Mohd Nor et al., 2012). Nos animais que se recuperam, os prejuízos podem se estender até a vida adulta, decorrente do retardo no crescimento, e nas fêmeas, pelo atraso substancial da idade ao primeiro parto (Donovan et al., 1998; Mohd Nor et al., 2012).

A etiologia das diarreias é multifatorial, resultando da interação do animal com o ambiente, a nutrição e os agentes infecciosos (Benesi, 1999). Os fatores nutricionais estão associados à ingestão excessiva de leite ou ração, e os fatores ambientais à presença de agentes enteropatogênicos como bactérias (*Escherichia*

*coli*, *Salmonella* sp., *Clostridium perfringens*), vírus (*Rotavirus* e *Coronavirus*), protozoários (*Eimeria* sp.) e verminoses, além do manejo higiênico-sanitário deficiente (Bouda et al., 2000).

Os rotavírus são considerados em todo o mundo como um dos principais vírus entéricos tanto para humanos quanto animais (Parashar et al., 2003). A associação deste agente à doença diarreica foi primeiramente descrita em bezerros de duas a quatro semanas de vida por Mebus et al. (1969).

## 2.2 CARACTERÍSTICAS GERAIS DE ROTAVÍRUS

Os rotavírus pertencem à família *Reoviridae*, gênero *Rotavirus*. Apresentam partículas virais de aproximadamente 75 nm de diâmetro, formato icosaédrico e não envelopadas. Seu genoma é composto por 11 segmentos de RNA fita-dupla que é responsável por sintetizar seis proteínas virais estruturais (VP) denominadas VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 e VP7; e seis proteínas não estruturais (NSP) variando entre NSP1 a NSP6 (Estes e Kapikian, 2007).

Os rotavírus são classificados em 10 grupos (A–J) baseados em relações antigênicas de suas proteínas VP6, com espécies provisórias I e J recentemente identificadas em cães da Hungria e em morcegos na Sérvia, respectivamente. Os grupos mais comuns que infectam humanos e animais são os grupos A, B e C com a maior prevalência do grupo A. As rotavirose do grupo A representam uma das causas mais significativas de diarreia aguda tanto em humanos como em animais (Estes e Kapikian, 2007; Matthijnssens et al., 2012; Mihalow- Kovacs et al., 2015; Banyai et al., 2017).

O capsídeo viral é composto por três camadas de proteínas estruturais, sendo uma camada externa, uma camada intermediária, e o “core”. As proteínas virais estruturais estão nomeadas por ordem decrescente da massa molecular. No “core” estão presentes as proteínas VP1 (125 kDa), VP2 (94 kDa) e VP3 (88 kDa); na camada intermediária a VP6 (44,8 kDa), e na camada externa as proteínas VP4 (86,7 kDa) e VP7 (37,4 kDa). As proteínas não-estruturais variam entre NSP1 a NSP5 (Estes, 2001). Estas diferenças no peso molecular podem ser utilizadas para

caracterizar perfis eletroforéticos pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) (Saif, 2011). Cada proteína sintetizada exerce uma atividade, como está descrito no Quadro 1.

**Quadro 1.** Características e funções das proteínas codificadas pelo RNA segmentado dos *Rotavirus*.

Segmento genômico	Proteína	Localização	Características e funções
1	VP1	“Core”	RNA polimerase RNA dependente
2	VP2	“Core”	Mais abundante no “core” e liga-se ao RNA viral
3	VP3	“Core”	Guaniltransferase
4	VP4	Capsídeo Externo	Contém um sítio de clivagem pela tripsina que ao submetida ao tratamento “in vitro” gera as proteínas VP5* e VP8* aumentando a infectividade; Proteína de ligação à célula. Interage com a VP6; Antígeno neutralizante P
6	VP6	Capsídeo Intermediário	Proteína estrutural do capsídeo intermediário (780 moléculas); Antígeno de subgrupo
9	VP7	Capsídeo Externo	Antígeno neutralizante G
5	NSP1	Proteína não estrutural	Associa-se ao citoesqueleto; Interagem com o fator 3 regulatório de interferon
8	NSP2	Proteína não estrutural	Atividade NTPase. Liga-se a NSP5
7	NSP3	Proteína não estrutural	Regulação da tradução
10	NSP4	Proteína não estrutural	Enterotoxina; Papel na morfogênese; modula íons Ca <sup>2+</sup> intracelular
11	NSP5	Proteína não estrutural	Ligação ao RNA, forma viroplasma com NSP2, interage com VP2 e NSP6
	NSP6	Proteína não estrutural	Interage com NSP5, presente no viroplasma

Fonte: Adaptado de Estes e Kapikian (2013)

A proteína VP6 foi a primeira a ser utilizada para efeito de classificação do vírus; tanto ela quanto a VP4 são proteínas imunogênicas, que após a infecção induzem síntese de anticorpos. Variantes da glicoproteína VP7 definem o tipo G e as da VP4, proteína sensível à protease, o tipo P. Esta determinação é realizada por genotipagem (Svensson et al., 1991; Ciarlet et al., 2008; Matthijssens et al., 2008).

Na literatura já foram descritos 27 genótipos G distintos, (Matthijssens et al., 2011; Miyazaki et al., 2011) e 38 diferentes genótipos P (Fujii et al., 2016). São considerados epidemiologicamente relevantes para a espécie bovina os genótipos

G6, G8 e G10 em associação com P[1], P[5], P[11], P[15] e P[21] (Snodgrass et al., 1986; Ishizaki et al., 1996; Estes e Kapikian, 2007; Martella et al., 2010; Papp et al., 2013), enquanto estirpes pertencentes a G1–G3, G5 e G11 e P[3], P[6] e P[14] são detectadas esporadicamente. Nos seres humanos são comumente detectadas G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8] e G9P[8] (Gentsch et al., 2005; Santos e Hoshino, 2005; Banyai et al., 2017).

Os rotavírus são espécie-específicos, entretanto a habilidade de transmissão entre espécies de mamíferos diferentes é evidenciada desde a década de 1980 (Dhama et al., 2009), sendo mais provável a ocorrência em países em desenvolvimento, em que há influência de condições precárias de higiene, e do maior convívio de humanos com animais, principalmente bovinos, suínos e aves (Jain et al., 2001; Martella et al., 2006).

Castrucci et al. (1984) demonstraram que bezerros eram suscetíveis à infecção de rotavírus a partir de coelhos, os quais, por sua vez, também se infectavam com rotavírus bovino. Bezerros são igualmente suscetíveis à infecção por vírus de origem suína, roedores e primatas não humanos. A presença de rotavírus de origem bovina já foi detectada em cães e gatos e a transmissão do vírus de mamíferos para aves também já foi documentada (Schwers et al., 1983; Wani et al., 2003). O advento da biologia molecular permitiu identificar variantes dos vírus de origem animal infectando humanos em diferentes partes do mundo, inclusive no Brasil (Luchs et al., 2012).

## **2.3 PATOGENIA**

A transmissão dos rotavírus ocorre principalmente por via fecal-oral por meio de partículas virais encontradas no ambiente, na água e nos alimentos contaminados pelas fezes de animais doentes (Bridger, 1994).

Após a ingestão do vírus, o mesmo tem tropismo pelas células apicais que recobrem as vilosidades do intestino delgado, local em que infecta os enterócitos maduros. Ao se multiplicar nos enterócitos, o rotavírus provoca a descamação dessas células e sua destruição, a migração das células da cripta para as

vilosidades é acelerada, provocando a perda temporária da capacidade absorptiva (Ramig, 2004; Estes e Kapikian, 2007). Depois da replicação citolítica, novas partículas virais são liberadas e podem infectar as porções mais distais do intestino delgado e/ou serem excretadas pelas fezes em altas concentrações (Desselberger, 2001).

Nos animais com mais de três semanas de idade, os enterócitos sofrem renovações periódicas ocorrendo migração das criptas para a extremidade das vilosidades em dois a quatro dias, competindo com a replicação viral. Em animais mais jovens, com idade entre duas a três semanas, esse tempo de renovação é maior, sendo de sete a dez dias no jejuno e íleo, facilitando o desenvolvimento completo do ciclo replicativo e a produção viral, o que justifica maior suscetibilidade desses animais. A doença clínica também não é frequente na primeira semana de vida do animal, provavelmente pela transmissão passiva dos anticorpos maternos com conseqüente neutralização viral (Cook et al., 2004).

## **2.4 DIAGNÓSTICO**

Considerando a semelhança dos sinais clínicos determinados por diferentes enteropatógenos, o diagnóstico definitivo das rotaviroses depende essencialmente da realização de testes laboratoriais. A grande quantidade de partículas virais excretadas no período agudo da infecção permite a aplicação de métodos de diagnóstico direto (Estes e Kapikian, 2007).

A microscopia eletrônica utilizada como método pioneiro para o diagnóstico do vírus é um teste rápido e de alta especificidade, porém com custo de execução elevado e necessidade de equipe qualificada, não permite ser utilizado em larga escala (Brandt et al., 1981). O ensaio imunoenzimático (ELISA), disponível comercialmente na forma de “kits”, permite o teste de várias amostras simultaneamente (Pereira et al., 1985).

A técnica de PAGE, associada ao aspecto segmentado do genoma do rotavírus, tem sido a mais utilizada na triagem de amostras diarreicas (Bonaduce, 1990). O RNA viral é previamente extraído da amostra biológica e separado em gel



de poliacrilamida de acordo com as massas moleculares e a velocidade de migração dos 11 segmentos (Pereira et al., 1983). Essa técnica é frequentemente utilizada em estudos epidemiológicos de infecções por rotavírus, indicando aspectos importantes da infecção, como diferenças nos perfis genômicos (McNulty e Logan, 1983; Ishizaki et al., 1996).

Técnicas moleculares, como a reação em cadeia da polimerase precedida de transcrição reversa (RT-PCR), têm sido amplamente empregadas tanto para o diagnóstico como para a caracterização dos genótipos G e P do vírus. Para isso, são mais utilizados “primers” específicos que amplificam segmentos dos genes que codificam as proteínas VP7 (G) e VP4 (P) de rotavírus (Gentsch et al., 1992).

## **2.5 PREVENÇÃO E CONTROLE DA ROTAVIROSE BOVINA**

Para a prevenção das diarreias neonatais destaca-se o manejo apropriado do bezerro clinicamente afetado e do ambiente, sendo crucial para minimizar as perdas econômicas e garantir a diminuição do impacto ao bem-estar animal e ambiental (Lorenz et al., 2011).

A imunidade determinada pelos rotavírus, por meio de infecção natural ou antígenos presentes nas vacinas comerciais, atua contra infecções de sorótipos homólogos de rotavírus para os quais os animais foram expostos anteriormente (Oliveira et al., 1994). O fato de os bezerros nascerem praticamente desprovidos de anticorpos associado ao desenvolvimento incompleto do sistema imune torna extremamente importante a ingestão do colostro para a aquisição de anticorpos maternos e proteção contra a diarreia por rotavírus (Saif et al., 1984; Robison et al., 1988; Tizard, 2002). Recomenda-se que animais sadios ingiram três litros de colostro de boa qualidade das mães, dentro de quatro horas de nascimento, alcançando um total de quatro litros nas 12 primeiras horas de vida (Chigerwe et al., 2009). Desta forma, a ingestão de colostro de boa qualidade pode prevenir a incidência da doença nos neonatos ou reduzir a severidade da diarreia.

Com o propósito de fornecer colostro de alta qualidade aos neonatos, preconiza-se a vacinação das fêmeas gestantes. Vários estudos têm demonstrado

que a vacinação de vacas prenhes com vacinas de rotavírus vivo ou inativado é capaz de elevar significativamente os títulos de anticorpos séricos, os quais são transferidos para o colostro e o leite, protegendo passivamente os bezerros (Castrucci et al., 1988; Tsunemitsu et al., 1989). Entretanto, em estudos a campo, a eficácia da vacinação materna é variável, sendo constatados diferentes resultados quanto ao nível de proteção dos bezerros à exposição viral (Bellinzoni et al., 1987; Kohara et al., 1997).

Para o controle e a prevenção da diarreia neonatal bovina estão disponíveis no mercado nacional vacinas contendo os genótipos G6 e G10. Novilhas e vacas não vacinadas devem receber duas doses de vacinas, dois meses e um mês antes do parto, no qual os anticorpos serão transferidos passivamente para os bezerros pelo colostro (Barreiros et al., 2004).

Diferentes genótipos de rotavírus, novas variantes ou a reemergência de alguns genótipos que foram previamente controlados pela vacina podem ocorrer e difundir-se na população em condições adequadas. A pressão imune induzida pela vacinação em massa pode ser responsável por promover ressortimento entre as estirpes resultando também em transmissão zoonótica (Matthijnssens et al., 2011). Para a adoção de um programa de vacinação eficaz deve ser considerada a variação molecular das estirpes virais circulantes em uma determinada região e seu constante monitoramento.

## **2.6 EPIDEMIOLOGIA DAS ROTAVIROSES EM BOVINOS**

Estudos de caráter epidemiológico de rotavirose em bovinos têm sido realizados em diferentes países e com variadas taxa de prevalência. Na Espanha, o rotavírus foi detectado em 25% das amostras fecais de bezerros diarreicos até 30 dias de idade em rebanhos leiteiros, associados à presença de coronavírus, *Cryptosporidium* spp. *E. coli* K99 e *Salmonella* spp. A idade média de animais infectados por rotavírus foi de 12,9 dias (García et al., 2000).

Na Turquia foi encontrada taxa de prevalência de 18,2% de rotavirose em bezerros recém-nascidos, além da coinfeção com coronavírus e *E. coli* K99 (Ok et

al., 2009). Na Holanda, Bartels et al. (2010) pesquisando cinco enteropatógenos (*E. coli* K99, coronavírus, rotavírus, *Cryptosporidium* spp. e *C. perfringens*) em animais com diarreia de oito a 14 dias de idade, encontraram prevalência de 17,7% para rotavírus.

Garaicoechea et al. (2006) relataram a ocorrência de diarreia por rotavírus e os genótipos das estirpes circulantes, em rebanhos bovinos leiteiros da Argentina, durante um período de 10 anos (1994-2003). O vírus foi detectado em 62,5% do total de casos de diarreia estudados. As amostras positivas foram genotipadas e identificadas como: 60% G6P[5], 4,4% G10P[11], 4,4% G6P[11] e 2,4% G10P[5].

Na China, Wei et al. (2013) investigaram as características epidemiológicas e a distribuição genotípica de rotavírus bovino em amostras de fezes de bezerros com diarreia. Os autores encontraram 41% de amostras positivas pelo ELISA. A caracterização molecular das amostras positivas pela RT-PCR indicou maior ocorrência do genótipo G6P[5], seguido de G6P[5+11], G10P[5+11] e G6+G10P[5].

No Brasil, investigações conduzidas por pesquisadores de diferentes regiões do país foram capazes de associar o rotavírus bovino com quadros de diarreia em bezerros, demonstrando a disseminação do vírus. Barbosa et al. (1998) estudaram 33 propriedades da bacia leiteira de Minas Gerais, colhendo 194 amostras fecais de bezerros com até 60 dias de nascidos. Pela técnica de ELISA detectaram 17% de amostras positivas para rotavírus, das quais 60,6% eram diarreicas. No mesmo estado, Ferreira et al. (2009) estudaram a prevalência de patógenos intestinais causadores de diarreia em bezerros de 20 propriedades leiteiras. Foram analisadas amostras de fezes de 319 animais, detectando taxa de prevalência de 8,0% para rotavírus.

No Estado de São Paulo, Langoni et al. (2004), estudaram amostras fecais de 203 bezerros com diarreia em bezerros até 30 dias. A prevalência de rotavírus encontrada foi de 25,1 (51/203) das amostras. No mesmo estado, estudo conduzido por Freitas et al. (2011) em 51 rebanhos leiteiros com 103 amostras de fezes de bezerros com diarreia e 308 amostras de animais sem diarreia, com idade entre um e 45 dias, detectou prevalência de rotavírus em 21,6% (11/51) dos rebanhos e 6,7% (27/404) dos bezerros. A maior frequência de infecção foi determinada em bezerros

com idade entre um e 15 dias. Ainda em São Paulo, Buzinaro et al. (2009) estudaram a frequência de infecção e a classificação das estirpes de rotavírus circulantes em 649 amostras colhidas de bezerros de corte em propriedades rurais. Por meio da técnica de ELISA e PAGE, determinou-se a ocorrência de rotavírus em 6,2% dos animais. A genotipagem pela RT-PCR revelou que as estirpes circulantes nos rebanhos eram G6P[5], G6P[11], G6P[5]+P[11] e G10P[11].

Alfieri et al. (2004) utilizaram a técnica de RT-PCR para classificar as estirpes circulantes de rotavírus em bezerros de rebanhos leiteiros e de corte situados nos Estados do Mato Grosso do Sul, São Paulo, Goiás e Paraná. Foram detectadas infecções singulares com seis associações diferentes de G e P (G6P[1], G6P[5], G6P[11], G8P[11], G10P[11] e G5P[1]) e infecções mistas caracterizadas pelas associações G6P[1]+P[5] e G6+G8P[1].

No Estado de Goiás, Caruzo et al. (2010) estudaram a ocorrência de rotavírus em uma propriedade leiteira, colhendo 331 amostras de fezes de bezerros com menos de um mês de idade. Pela técnica de PAGE e ELISA, foram encontradas 33 (9,9%) amostras positivas para rotavírus, que foram genotipadas em G6P[1] (6,1%), G10P[11] (9,1%) e G6P[11] (15,2%). A maioria das amostras (51,6%) apresentou vários genótipos P, incluindo genótipos humanos típicos P[4] e P[6], sugerindo a ocorrência de coinfeções e rearranjos genéticos.

Em rebanhos de corte do Estado de Mato Grosso, Cabral (2014) detectou prevalência de 4,41% de rotavírus em neonatos sem sinais clínicos de diarreia. As amostras positivas genotipadas pertenciam ao genótipo G6P[11].

Medeiros et al. (2014) estudaram um surto de diarreia em rebanhos bovinos de corte de alta produção, em sistema de manejo extensivo no Estado de Mato Grosso do Sul, com alta taxa de morbidade (60%) e mortalidade (7%). O rotavírus foi detectado pela PAGE em 80% das amostras analisadas. A caracterização genotípica das amostras positivas identificou o genótipo G6P[11] como o responsável pelo surto de diarreia em bezerros.

Os diferentes estudos epidemiológicos realizados no Brasil e no mundo mostram a importância das rotavirose como agentes causadores de diarreias em rebanhos leiteiros e de corte e a necessidade da constante vigilância dos genótipos

para melhor caracterização e entendimento da enfermidade assim como para a adoção de medidas de controle e prevenção.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Analisar dados epidemiológicos sobre a ocorrência de rotavirose em rebanhos bovinos leiteiros e de corte dos Estados de Minas Gerais, Goiás e Mato Grosso do Sul, no período de 2006 a 2010.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar a frequência de infecção por rotavírus em bezerros de rebanhos bovinos leiteiros e de corte, dos Estados de Minas Gerais, Goiás e Mato Grosso do Sul;
- Verificar a distribuição de casos positivos de rotavírus nos rebanhos bovinos desses estados de acordo com a presença de sinais clínicos de diarreia e faixa etária dos animais;
- Determinar a distribuição de casos positivos para rotavírus nos rebanhos bovinos, ao longo dos meses dos anos estudados;
- Analisar o perfil eletroforético do genoma de rotavírus identificados nas amostras positivas;
- Analisar a distribuição dos genótipos G e P de rotavírus identificados nos rebanhos bovinos leiteiros e de corte do estudo.

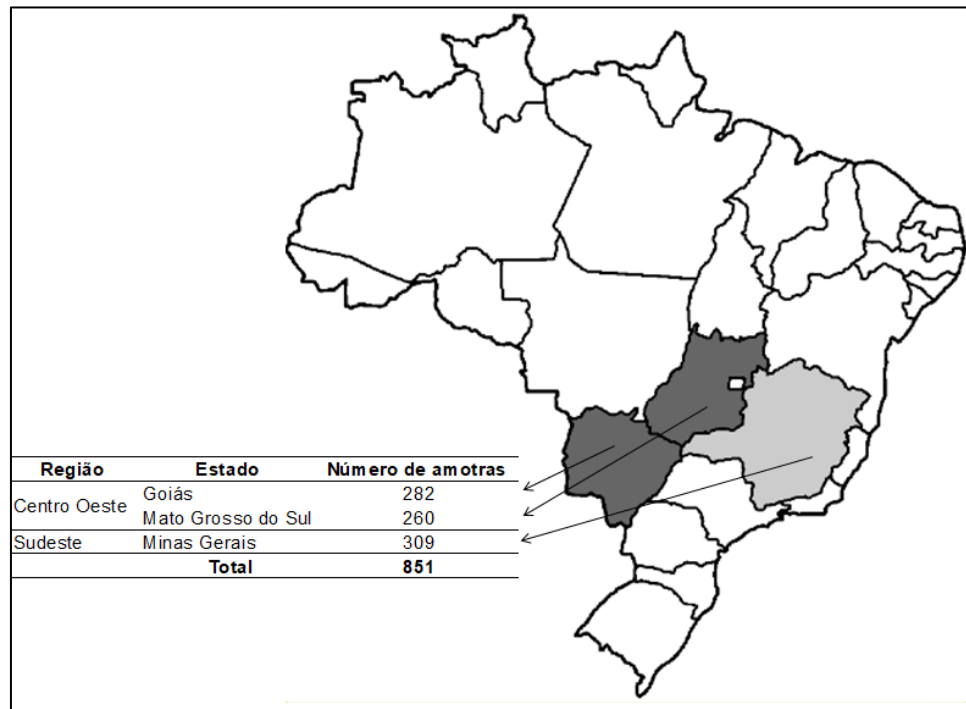
## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 ÁREA DE ESTUDO**

O presente estudo utilizou informações da infecção por rotavírus em rebanhos bovinos leiteiros e de corte dos Estados de Minas Gerais, Goiás e Mato Grosso do Sul, entre os anos de 2006 e 2010, obtidos no Laboratório de Rotavirose, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV/Unesp) de Jaboticabal, São Paulo.

No período considerado, foram amostrados 77 rebanhos bovinos, sendo 47 rebanhos leiteiros e 30 rebanhos de corte, provenientes dos três estados brasileiros, que compreendem a região Sudeste e Centro-Oeste, totalizando 851 amostras de fezes colhidas. As amostras foram obtidas de bezerros, na faixa etária de um a 90 dias de idade, independentemente da manifestação de sinais clínicos de diarreia. A Figura 1 mostra a quantidade de amostras de fezes colhidas dos animais, de acordo com o estado da federação de procedência.

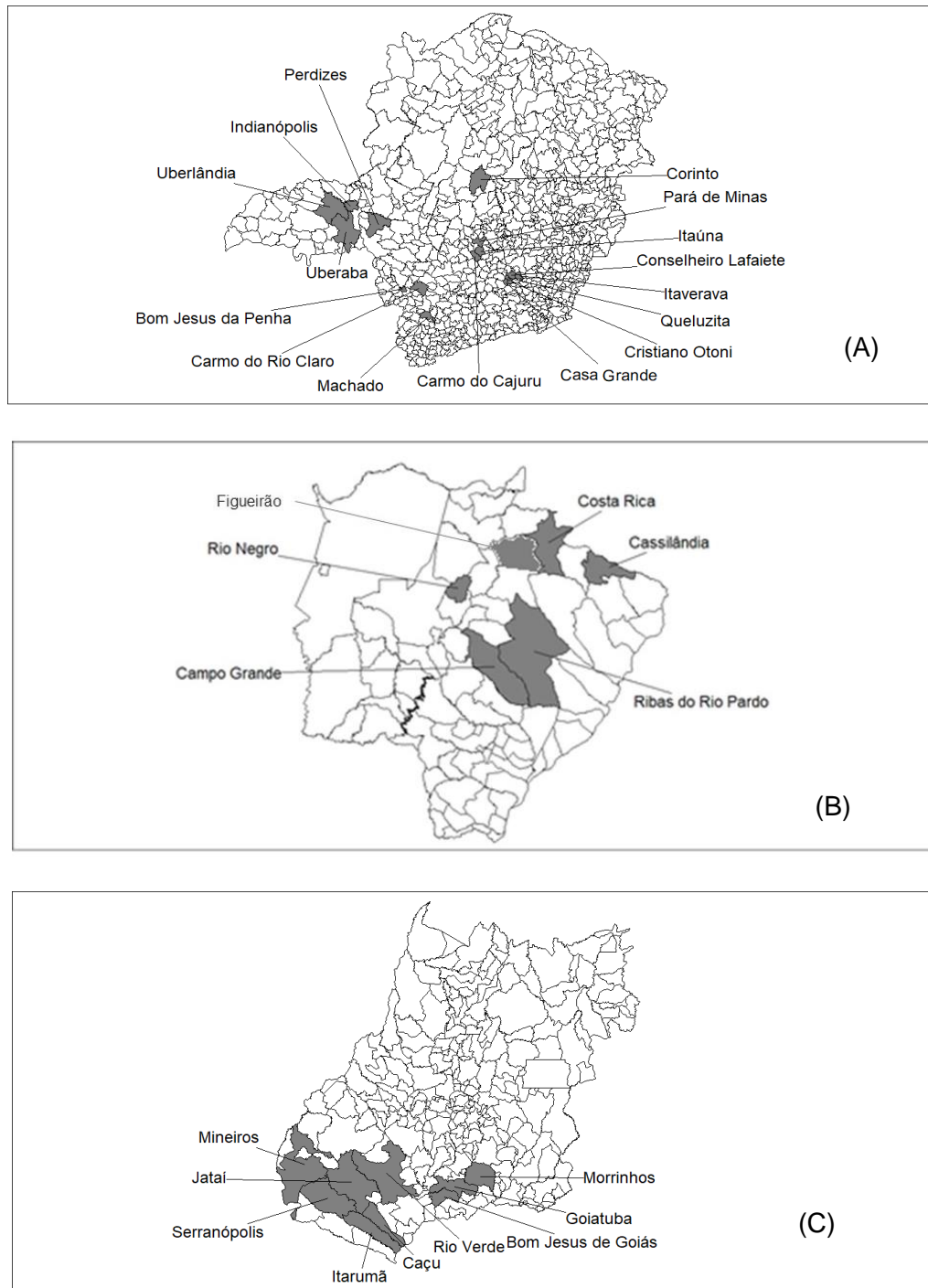
Em termos climáticos, essas regiões apresentam clima tropical semi-úmido com duas estações bem definidas, sendo um verão quente, úmido e chuvoso, e um inverno ameno e seco (Nimer, 1989).



**Figura 1.** Quantidade de amostras de fezes de bezerros colhidas de acordo com o estado da federação de procedência, no período de 2006 a 2010.

Os rebanhos bovinos amostrados foram provenientes de 31 municípios, sendo 16 do Estado de Minas Gerais, nove do Estado de Goiás e seis do Estado de Mato Grosso do Sul. Os mapas dos estados e os municípios onde se encontravam os rebanhos estudados estão apresentados na Figura 2.





**Figura 2.** Mapa da localização geográfica dos municípios do Estado de Minas Gerais (A), municípios do Estado de Goiás (B), e municípios do Estado de Mato Grosso do Sul (C), onde encontravam-se os rebanhos estudados, entre 2006 e 2010.

As amostras de fezes dos bezerros foram colhidas diretamente da ampola retal em sacos plásticos, identificadas e mantidas em caixas isotérmicas refrigeradas até serem armazenadas no laboratório à temperatura de -20°C. No momento da colheita foram obtidas informações sobre a idade, consistência das fezes (diarreicas ou não), categoria do animal (rebanho leiteiro ou de corte) e informações sobre a procedência (estado e município). Entretanto, não havia informação sobre a ocorrência de vacinação dos rebanhos. Os dados obtidos durante a colheita das amostras foram anotados no caderno de registro do Laboratório de Rotavirose da FCAV/Unesp, o qual foi utilizado rotineiramente para consulta das informações que foram a base deste estudo.

Os protocolos das técnicas utilizadas para a pesquisa de rotavírus (PAGE) e para a genotipagem viral (RT-PCR) foram consultados e encontram-se descritos a seguir.

## **4.2 ANÁLISE DA PRESENÇA DE ROTAVÍRUS PELA TÉCNICA DE PAGE**

Para detecção de amostras positivas para rotavírus foi utilizada a técnica de PAGE, conforme descrito por Herring et al. (1982) e Pereira et al. (1985).

### **4.2.1 Preparação das suspensões fecais**

Foram preparadas suspensões das amostras de fezes a 20% em tampão Tris/Cálcio (Tris/HCl 0,1 M; CaCl<sub>2</sub> 1,5 mM, pH-7,3), as quais foram homogeneizadas periodicamente por 30 minutos à temperatura ambiente, seguidas de centrifugação a 1.030 x g por 15 minutos. O sobrenadante obtido foi transferido para microtubos, os quais foram utilizados para a extração do RNA viral ou armazenados à temperatura de -20°C para análise posterior.

#### **4.2.2 Extração de RNA, preparo e coloração do gel de poliacrilamida**

A extração do RNA do rotavírus foi realizada adicionando 0,4 mL do sobrenadante de cada amostra à microtubos contendo 40 µL de SDS a 10%, seguido de incubação a 37°C por 30 minutos. Após, foram adicionados 200 µL de fenol destilado e 200 µL de clorofórmio, os quais permaneceram à temperatura ambiente por 15 minutos seguidos de centrifugação a 1.030 x g por 10 minutos. Os sobrenadantes obtidos foram transferidos para microtubos contendo 40 µL de NaCl a 20% e 1,0 mL de etanol refrigerado. Os microtubos foram agitados em vórtex e incubados à temperatura de -20°C “overnight”.

Após esse período, os microtubos foram centrifugados a 4.300 x g por 30 minutos e os sobrenadantes obtidos foram desprezados. Os microtubos foram invertidos em papel filtro para secagem do “pellet”, os quais foram ressuspensos com 15 µL de dissociador de amostra. Após incubação a 37°C durante 30 minutos, as amostras foram distribuídas no gel de poliacrilamida.

O gel de poliacrilamida foi obtido a partir de uma solução de acrilamida/bisacrilamida na concentração de 30/0,8. A visualização dos segmentos do genoma do rotavírus foi feita pela coloração com nitrato de prata. Foi utilizada como controle positivo a estirpe padrão de rotavírus bovino NCDV (“Nebraska Calf Diarrhea Virus”) cedida pelo Prof. Dr. José Antônio Jerez do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal-VPS, da Universidade de São Paulo/SP.

#### **4.3 ANÁLISE DO PERFIL ELETROFORÉTICO**

A classificação das amostras quanto aos diferentes perfis eletroforéticos, baseou-se nas diferenças de velocidade de migração dos segmentos genômicos, utilizando-se o método de Lourenço et al. (1981). Esse método consiste na divisão dos 11 segmentos do RNA de rotavírus do grupo A em quatro classes ou arranjos denominados classe I (segmentos 1 a 4), classe II (segmentos 5 e 6), classe III

(segmentos 7 a 9) e classe IV (segmentos 10 e 11). Pequenas variações de peso molecular dentro de cada classe interferem no perfil de migração, indicando a presença de perfis eletroforéticos distintos, ou diferentes eletroferótipos. Para tanto, cada segmento genômico da amostra de rotavírus de campo foi comparado com os respectivos segmentos da amostra padrão NCDV. A análise do perfil de migração das amostras de campo tem sido utilizada para caracterizar as amostras de rotavírus, identificando a circulação de diferentes perfis durante os surtos de diarreia.

#### **4.4 GENOTIPAGEM DAS AMOSTRAS POSITIVAS PELA RT-PCR**

A RT-PCR foi utilizada para a caracterização dos genótipos G e P de rotavírus bovino, baseando-se na metodologia descrita por Gouvea et al. (1990, 1994a) e Gentsch et al. (1992).

O comprimento (número de pares de base) do segmento genômico produzido e amplificado na PCR, foi utilizado para a classificação das amostras positivas, comparando à amostra padrão NCDV de rotavírus cultivados em células MA-104. As reações em que se observou a amplificação de segmentos para dois ou mais genótipos foram refeitas mediante a utilização de “primer” único, com o objetivo de confirmar os achados.

##### **4.4.1 Extração do RNA de rotavírus bovino**

O RNA foi extraído a partir de suspensão fecal a 50% preparada em água tratada com DEPC (dietilpirocarbonato), e posteriormente clarificada por centrifugação a 4.300 x g por 15 minutos à temperatura de 4°C. Após, 250 µL da suspensão fecal obtida anteriormente foram adicionadas a 750 µL de TRIZOL Reagent® (Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA), homogeneizados e após incubação de 5 minutos à temperatura ambiente, foram adicionados 200 µL de clorofórmio. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 4.300 x g por 15 minutos a 4°C, sendo o sobrenadante transferido a um novo microtubo. Para a precipitação do RNA viral, 500 µL de isopropanol foram adicionados, seguidos de incubação por 15 minutos a

-20°C. A seguir, a amostra foi centrifugada a 4.300 x g por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante foi desprezado. Ao material precipitado foram adicionados 950 µL de etanol a 75% o qual foi novamente centrifugado nas mesmas condições por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e após secagem em banho-maria seco a 56°C, o “pellet” foi ressuscitado em 17 µL de água tratada com DEPC. A amostra foi incubada a 56°C por 10 minutos e conservada à temperatura de -20°C até o momento do uso.

#### **4.4.2 Síntese do DNA complementar (cDNA) e PCR**

Para a síntese do cDNA foi utilizado o kit Super Script™ One-Step RT-PCR with Platinum® Taq (Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA), processando-se em uma única etapa a síntese do cDNA e a PCR dos genes que codificavam para a proteína VP7 (G) ou para a proteína VP4 (P). A PCR foi processada em termociclador “Mastercycle” da marca Eppendorf®.

Assim, 5 µL do produto de extração do RNA, previamente desnaturados a 95°C por 5 minutos e mantidos em gelo, foram adicionados ao “mix” de reagentes contendo 12,5 µL do tampão de reação (2x Reaction mix: 0,4 mM de dNTPs; 2,4 mM MgSO<sub>4</sub>), 0,5µL da enzima RT/Platinum Taq (Transcriptase Reversa) e 1,25 µL dos “primers” senso e anti-senso específicos para cada um dos genótipos G ou P, conforme descrito por Gouvea et al. (1990, 1994a, 1994b) e Gentsch et al.(1992) (“primers” Beg9, End9, End9CRW8, End9UK e “primers” con3 e con2, respectivamente), na concentração final de 10 pmol/µL cada. O volume da reação foi completado para 25 µL com água tratada com DPEC. Os “primers” utilizados estão apresentados no Quadro 2.

A síntese do cDNA foi realizada incubando-se a reação por 30 minutos a 45°C seguido de 1 ciclo de 2 minutos a 94°C. A seguir, o cDNA produzido foi amplificado executando-se 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 2 minutos a 45°C e 1 minuto a 72°C. A extensão final foi realizada por 10 minutos a 72°C.

**Quadro 2.** Sequência de bases dos “primers” utilizados para a genotipagem G e P de rotavírus bovino, sua posição no genoma, tamanho do segmento esperado e referências.

Primer	Sequência de bases	Genótipo	Tamanho	Referência
<b>Beg 9</b>	GGCTTTAAAAGAGAGAATTTCCGTCTGG		'Primer'sense	Gouvea et al. (1990)
<b>End 9</b>	GGGGTCACATCATAAATTCTAATCTAAG		'Primer' antisense	
<b>DT6</b>	CTAGTTCCTGTGTAGAATC	G6	500 bp	Gentsch et al. (1992)
<b>HT8</b>	CGGTTCCGGATTAGACAC	G8	274 bp	
<b>ET10</b>	TTCAGCCGTTGCGACTTC	G10	715 bp	
<b>FT5</b>	CATGTACTCGTTGTTACGTC	G5	780 bp	
<b>BT11</b>	GTCATCAGCAATCTGAGTTGC	G11	337 bp	
<b>Con 2</b>	ATTTCCGGACCATTTATAACC		'Primer' antisense	Gouvea et al. (1994)
<b>Con 3</b>	TGGCTTCGCTCATTATAGACA		'Primer' sense	
<b>pNCDV</b>	CGAACGCGGGGGTGGTAGTTG	P[1]	622 bp	
<b>pUK</b>	GCCAGGTGTCGCATCAGAG	P[5]	555 bp	
<b>pB223</b>	GGAACGTATTCTAATCCGGTG	P[11]	314 bp	
<b>pOSU</b>	CTTTATCGGTGGAGAATACGTCAC	P[7]	502 bp	
<b>pGott</b>	GCTTCAACGTCCTTTAACATCAG	P[6]	423 bp	

#### 4.4.3 Multiplex “semi-nested” PCR

A segunda amplificação (multiplex “semi-nested” PCR) foi utilizada para a classificação das estirpes de rotavírus e consistiu em adicionar 0,5 µL de DNA amplificado na etapa anterior à solução composta por 2,5 µL de 10x PCR buffer II; 0,75 µL de MgCl<sub>2</sub>-50 mM; 0,5 µL de DNTPs-10 mM; 0,625 µL na concentração de 20 pmol/µL de “primer” mix G ou P (SBeg9, DT6, ET10, HT8, FT5, BT11 ou Con2, PB223, PGOOT, PNCDV, POSU, PUK, e 0,13 µL da enzima Taq DNA polimerase (50U).

O volume da reação foi completado para 25 µL com água tratada com DPEC. A reação de multiplex “semi nested” PCR foi submetida a 94°C por 2 minutos, seguida de 25 ciclos de 1 minuto a 94°C, 2 minutos a 55°C e 1 minuto a 72°C. A extensão final foi realizada a 72°C por 10 minutos. Em seguida, 8 µL dos produtos

oriundos da segunda amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% (p/v) em tampão TBE (Tris 0,089 M; ácido bórico 0,089 M; EDTA 0,002 M, pH 8,0), fazendo-se corar o gel em banho de água com 0,5 µg/mL de brometo de etídeo por 15 minutos. Utilizou-se como controle positivo a amostra NCDV de rotavírus e água tratada com DPEC como controle negativo.

#### **4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

A análise estatística foi aplicada nos resultados gerais e por estado (Minas Gerais, Goiás e Mato Grosso do Sul) para avaliar a frequência da infecção por rotavírus, entre rebanhos leiteiros e de corte, e amostras diarreicas e não diarreicas. Ainda, a estatística foi aplicada para comparar a frequência da infecção em diferentes faixas etárias dos bezerros nos dois tipos de exploração pecuária e entre os períodos chuvosos e secos ao longo dos anos estudados (2006 a 2010).

O teste estatístico qui-quadrado foi utilizado, com nível de confiança de 95%, de acordo com Thrusfield (2005), pelo programa estatístico Epi Info™ 7.1.4. O programa MapInfo Professional versão 7.5 foi utilizado para construção de mapas geográficos ilustrativos dos municípios e estados estudados.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 DETECÇÃO DA INFECÇÃO POR ROTAVÍRUS PELA PAGE

A presença de rotavírus foi avaliada no período de 2006 a 2010, nos rebanhos leiteiros e de corte dos Estados de Minas Gerais, Goiás e Mato Grosso do Sul, com taxa de prevalência de 29,9% (23/77) entre o total de rebanhos e 7,1% (60/851) entre as amostras analisadas. Entre os rebanhos leiteiros estudados, 17% (8/47) apresentaram bezerros com resultados positivos para rotavírus, enquanto nos rebanhos de corte, 50% (15/30) dos rebanhos foram positivos. A frequência de positivos nas amostras de bezerros leiteiros foi de 3,1% (15/481), e nos bezerros de corte, 12,2% (45/370). Os resultados estão apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Resultados gerais, de acordo com o tipo de exploração e consistência das fezes, da técnica de PAGE, para detecção de rotavírus em bezerros dos Estados de Minas Gerais, Goiás e Mato Grosso do Sul, no período de 2006 a 2010

Procedência	Exploração	Rebanho			Total de amostras		
		Positivo	Total	%	Positivo	Total	%
<b>Minas Gerais</b>	Leite	4	33	12,1	7	255	2,7
	Corte	1	6	16,7	3	54	5,6
<b>Subtotal</b>		5	39	12,8	10	309	3,2
<b>Goiás</b>	Leite	3	13	23,1	7	216	3,2
	Corte	8	11	72,7	26	66	39,4
<b>Subtotal</b>		11	24	45,8	33	282	11,7
<b>Mato Grosso do Sul</b>	Leite	1	1	100,0	1	10	10,0
	Corte	6	13	46,2	16	250	6,4
<b>Subtotal</b>		7	14	50,0	17	260	6,5
<b>Totais</b>	<b>Leite</b>	<b>8</b>	<b>47</b>	<b>17,0</b>	<b>15</b>	<b>481</b>	<b>3,1</b>
	<b>Corte</b>	<b>15</b>	<b>30</b>	<b>50,0</b>	<b>45</b>	<b>370</b>	<b>12,2</b>
		<b>23</b>	<b>77</b>	<b>29,9</b>	<b>60</b>	<b>851</b>	<b>7,1</b>

As prevalências de rotavírus em bovinos podem variar de acordo com os rebanhos e metodologia empregados nos estudos. Resultados semelhantes foram encontrados em diversos países europeus, onde foram analisadas 2.021 amostras fecais de bovinos pertencentes a 1.092 fazendas, nas quais foram encontradas



diferentes frequências de infecção pelo vírus, variando de 5% na Hungria e Eslovênia a 46% na Dinamarca. Na Espanha, Garcia et al. (2000) detectaram 42,7% de prevalência de rotavírus em bezerros. Bartels et al. (2010) ao estudarem bovinos com até 30 dias de idade na Holanda, detectaram 17,7% de infecção por rotavírus, além da presença de outros enteropatógenos. As diferenças encontradas podem ser devido aos estudos abrangerem rebanhos com bezerros saudáveis em alguns países e em outros animais apresentando sinais clínicos de diarreia.

A infecção por rotavírus foi encontrada com maior frequência em bezerros de corte quando comparada às amostras de rebanhos leiteiros, sendo os resultados estatisticamente significativos ( $\chi^2 = 26,1$ ;  $p < 0,05$ ). Este fato pode ser resultado das diferentes práticas de manejo adotadas na produção de bovinos. A utilização da técnica de inseminação artificial em tempo fixo, que concentra o nascimento de bezerros em um determinado período, frequentemente na época das chuvas, pode facilitar a transmissão do agente. Outro fator importante na produção bovina é o manejo de bovinos leiteiros ser mais meticuloso que de bovinos de corte. A adoção de medidas higiênico-sanitárias mais intensas nos bovinos leiteiros pode reduzir a infecção dos bezerros nos primeiros dias de vida. Lorenzetti et al. (2013) não encontraram resultados positivos para rotavírus em rebanhos de corte nos Estados de Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná e Rondônia. No entanto, relatos da participação de rotavírus na etiologia da doença em bezerros de corte já foram descritos por Buzinaro et al. (2003) e Alfieri et al. (2004) em diversos estados do Brasil.

Das 851 amostras de fezes de bezerros colhidas, 199 amostras eram diarreicas. Destas, 22,6% (45/199) foram positivas para rotavírus na técnica de PAGE. Das 652 amostras colhidas de animais sem diarreia, 2,3% (15/652) foram positivas na PAGE. Os resultados encontrados estão apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2.** Resultados da técnica de PAGE para detecção de rotavírus, de acordo com a consistência das fezes, em bezerros dos Estados de Minas Gerais, Goiás e Mato Grosso do Sul, no período de 2006 a 2010.

Exploração	Total			Amostras diarreicas			Amostras não diarreicas		
	Nº	Positivo	(%)	Nº	Positivo	(%)	Nº	Positivo	(%)
Leiteira	481	15	3,1	71	6	8,5	410	9	2,2
Corte	370	45	12,2	128	39	30,5	242	6	2,5
<b>Total</b>	<b>851</b>	<b>60</b>	<b>7,1</b>	<b>199</b>	<b>45</b>	<b>22,6</b>	<b>652</b>	<b>15</b>	<b>2,3</b>

Os resultados apresentaram diferença estatística significativa entre amostras diarreicas e não diarreicas ( $\chi^2 = 95,99$ ;  $p < 0,05$ ), mostrando que amostras diarreicas estão associadas com a infecção pelo rotavírus. No Brasil, a ocorrência de diarreia aguda em bezerros foi associada à infecção por rotavírus em vários estudos (Brito et al. 2000; Alfieri et al. 2004; Caruzo et al. 2010; Silva et al. 2012). No entanto, a presença de animais assintomáticos eliminando o vírus contribui favoravelmente para a contaminação ambiental e sua disseminação, atuando como importantes fontes de infecção da enfermidade nos rebanhos bovinos.

### 5.1.1 Ocorrência de rotavírus no Estado de Minas Gerais

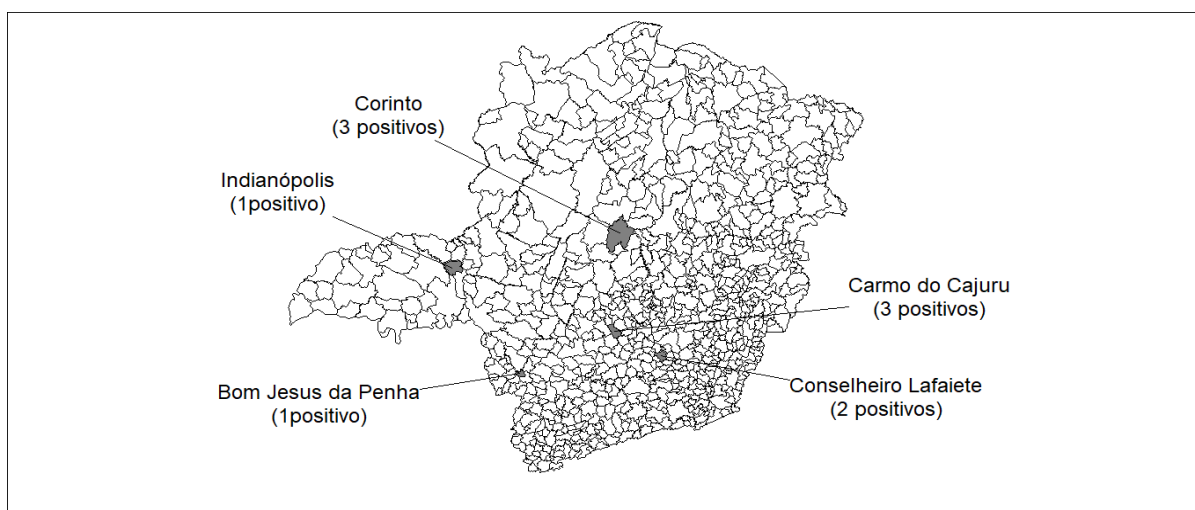
No Estado de Minas Gerais, a prevalência de rotavírus encontrada nas amostras de fezes foi de 3,2% (10/309). Entre os rebanhos, 12,8% (5/39) foram positivos. Das amostras obtidas de animais com diarreia, 10,8% (4/37) foram positivas, enquanto nas amostras não diarreicas, 2,2% (6/272) foram positivas. Os resultados estão descritos na Tabela 3.

**Tabela 3.** Resultados da técnica de PAGE para detecção de rotavírus em bezerros do Estado de Minas Gerais no período de 2006 a 2010.

Procedência	Exploração	Nº	Total		Amostras diarreicas		Amostras não diarreicas			
			Positivo	(%)	Nº	Positivo	(%)	Nº	Positivo	(%)
<b>Minas Gerais</b>	Leiteira	255	7	3	28	1	3,6	227	6	2,6
	Corte	54	3	5,6	9	3	33,3	45	0	0
<b>Total</b>		<b>309</b>	<b>10</b>	<b>3,2</b>	<b>37</b>	<b>4</b>	<b>10,8</b>	<b>272</b>	<b>6</b>	<b>2,2</b>

Nos rebanhos de corte deste estado, todos os casos positivos de rotavírus foram provenientes de amostras de fezes diarreicas. No estudo de Barbosa et al. (1998) foi encontrada maior prevalência do que o presente estudo, enquanto Dulgheroff et al. (2016) verificaram prevalência semelhante, no entanto, foram analisadas apenas amostras diarreicas.

Os resultados quando submetidos ao teste do qui-quadrado não foram significativos quando comparadas amostras positivas entre bezerros leiteiros e de corte. No entanto, para esse estado, houve relação estatística significativa entre a ocorrência de rotavírus e a manifestação clínica de diarreia ( $\chi^2 = 4,71$ ;  $p < 0,05$ ). A Figura 3 mostra a distribuição das amostras positivas para rotavírus nos municípios estudados do Estado de Minas Gerais.



**Figura 3.** Mapa do Estado de Minas Gerais destacando os municípios onde foram encontrados bezerros positivos para rotavírus, entre 2006 e 2010.

É importante salientar que as amostras positivas para rotavírus foram provenientes de municípios distintos, os quais não fazem limites geográficos uns com os outros, evidenciando a circulação viral em diferentes regiões do Estado de Minas Gerais.

Ferreira et al. (2009) pesquisando o agente em propriedades leiteiras nas regiões Centro Oeste e Alto Paranaíba de Minas Gerais, detectaram prevalência de 8%, além da associação de rotavírus nas infecções com algumas enfermidades parasitárias. A circulação do agente viral no Estado de Minas Gerais pode resultar em diversos impactos econômicos, principalmente pela importância na produção leiteira brasileira.

### 5.1.2 Ocorrência de rotavírus no Estado de Goiás

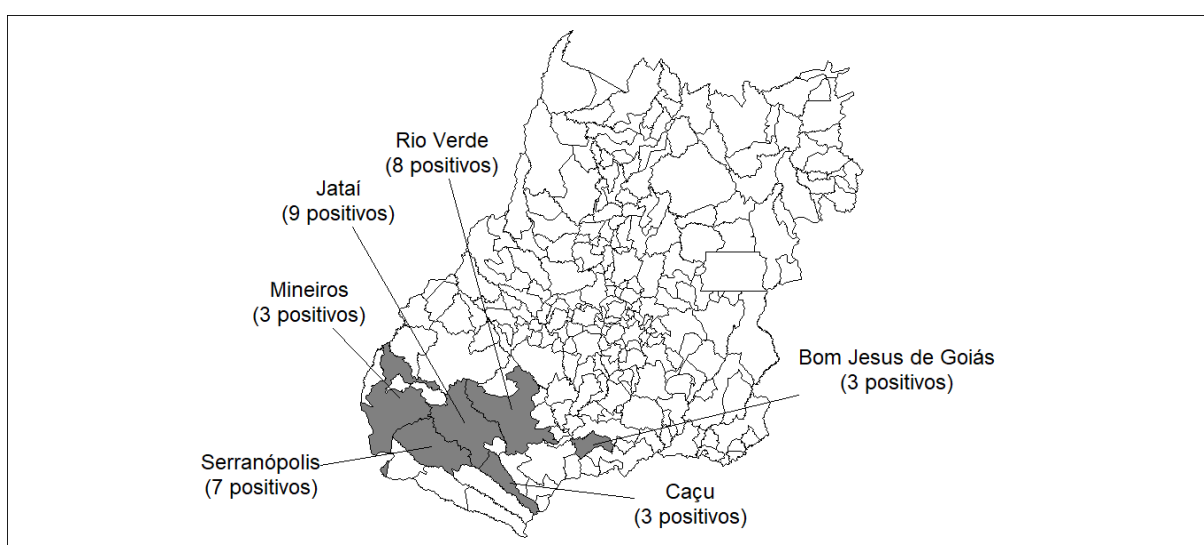
O Estado de Goiás obteve o maior número de amostras positivas para a infecção, com 11,7% (33/282) entre as amostras de fezes. A infecção pelo vírus foi verificada em 45,8% (11/24) dos rebanhos. Dos casos de diarreia, 29,4% (30/102) foram positivos e 1,7% (3/180) foram positivos em amostras não diarreicas. Os resultados desse estado encontram-se na Tabela 4.

**Tabela 4.** Resultados da técnica de PAGE para detecção de rotavírus em bezerros do Estado de Goiás no período de 2006 a 2010.

Procedência	Exploração	Total			Amostras diarreicas		Amostras não diarreicas			
		Nº	Positivo	(%)	Nº	Positivo	(%)	Nº	Positivo	(%)
Goiás	Leiteira	216	7	3,2	42	4	9,5	174	3	1,7
	Corte	66	26	39,4	60	26	43,3	6	0	0
<b>Total</b>		<b>282</b>	<b>33</b>	<b>11,7</b>	<b>102</b>	<b>30</b>	<b>29,4</b>	<b>180</b>	<b>3</b>	<b>1,7</b>

Neste estado também foi constatado que todos os casos positivos de rotavírus em rebanhos de corte eram provenientes de animais com diarreia. Suphoronski et al. (2016) também relataram a infecção por rotavírus no Estado de Goiás provenientes de animais com diarreia.

A análise dos dados pelo teste do qui-quadrado mostrou relação significativa entre a frequência de rotavírus e a presença de diarreia ( $\chi^2=46,39$ ;  $p<0,05$ ). Ao serem comparadas a frequência de positivos entre rebanhos leiteiros e de corte desse estado, encontrou-se diferença estatística significativa ( $\chi^2=63,94$ ;  $p<0,05$ ). Na Figura 4, estão destacados os municípios onde foram encontrados animais positivos para rotavírus.



**Figura 4.** Mapa do Estado de Goiás destacando os municípios onde foram encontrados bezerros positivos para rotavírus, entre 2006 e 2010.

Observa-se que os municípios com casos positivos para o agente estão muito próximos. Ainda, o Município de Mineiros faz divisa com outros dois estados, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, possibilitando a disseminação do vírus para outras regiões.

Alfieri et al. (2006) pesquisando rotavírus em diversos estados brasileiros encontraram 17,3% de amostras positivas no Estado de Goiás, taxa maior que a encontrada neste trabalho. Ao avaliar separadamente rebanhos leiteiros e de corte, evidenciou-se maior disseminação do agente viral em rebanhos de corte. No entanto, Brito et al. (2000) constatou maior taxa de prevalência em rebanhos leiteiros no Estado de Goiás.

### 5.1.3 Ocorrência de rotavírus no Estado de Mato Grosso do Sul

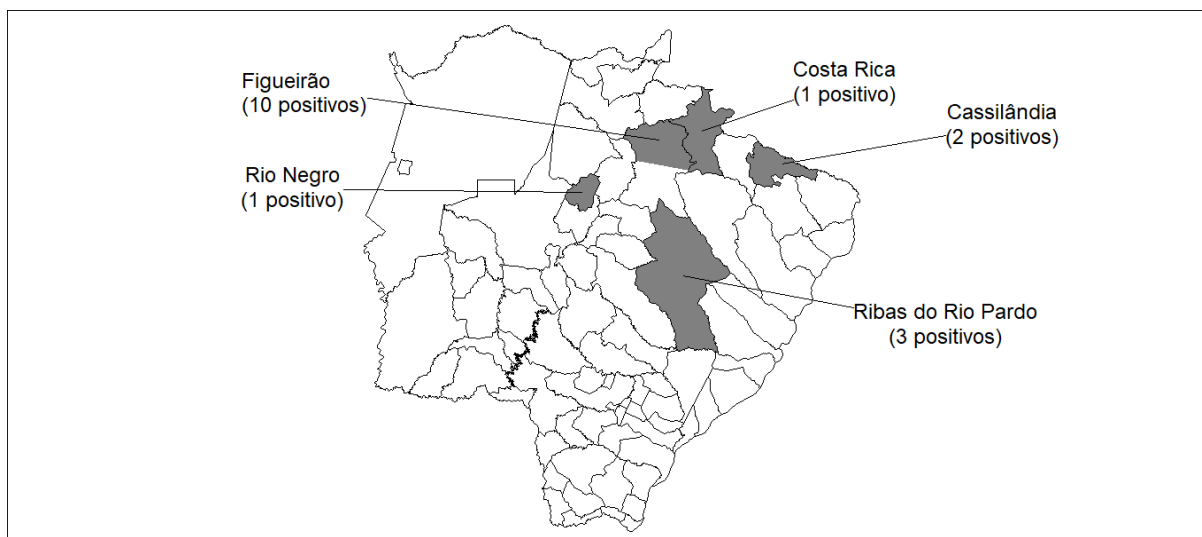
No Estado de Mato Grosso do Sul, 50% (7/14) dos rebanhos apresentaram pelo menos um animal positivo para rotavírus. Entre as amostras de fezes, 6,5% (17/60) foram positivas. Das amostras diarreicas, 18,3% (11/60) foram positivas, enquanto nas amostras não diarreicas, 3% (6/200) foram positivas. Os resultados estão descritos na Tabela 5.

**Tabela 5.** Resultados da técnica de PAGE para detecção de rotavírus em bezerros do Estado de Mato Grosso do Sul no período de 2006 a 2010.

Procedência	Exploração	Total			Amostras diarreicas		Amostras não diarreicas			
		Nº	Positivo (%)	Nº	Positivo (%)	Nº	Positivo (%)			
Mato Grosso do Sul	Leiteira	10	1	10	1	1	10	9	0	0
	Corte	250	16	6	59	10	16,9	191	6	3,1
<b>Total</b>		<b>260</b>	<b>17</b>	<b>6,5</b>	<b>60</b>	<b>11</b>	<b>18,3</b>	<b>200</b>	<b>6</b>	<b>3,0</b>

Neste estado, a maior parte das amostras foi proveniente de rebanhos de corte, sendo apenas uma amostra positiva obtida de rebanho leiteiro. Entre os animais de corte que apresentaram sinal clínico de diarreia, 16,9% (10/59) foram positivos na PAGE, já aqueles que não tinham o sinal clínico, 3,1% (6/191) apresentaram rotavírus nas fezes. Alfieri et al. (2006) e Suphoronski et al. (2016) relataram prevalência maior de rotavírus no Estado de Mato Grosso do Sul.

A Figura 5 mostra os municípios onde foram relatados casos positivos para rotavírus.



**Figura 5.** Mapa do Estado de Mato Grosso do Sul destacando os municípios onde foram encontrados bezerros positivos para rotavírus, entre 2006 e 2010.

Os dados foram analisados pelo teste do qui-quadrado e mostraram relação estatisticamente significativa ( $\chi^2 = 15,33$ ;  $p < 0,05$ ) entre a frequência de rotavírus e a manifestação clínica de diarreia. Ao serem comparados rebanhos leiteiros e de corte, não houve diferença estatisticamente significativa nos dois tipos de exploração para este estado.

## 5.2 INFLUÊNCIA DA IDADE NOS CASOS POSITIVOS DE ROTAVÍRUS

Informações referentes à faixa etária foram obtidas de 751 bezerros, permanecendo 100 animais sem identificação. Os dados totais mostraram prevalência de 9,6% (41/425) de rotavírus em animais na faixa etária de um a 30 dias; 4,2% (13/311), de 31 a 60 dias de idade; 6,7% (1/15) em bezerros maiores que 60 dias; e, prevalência de 5% (5/100) em animais sem identificação de idade. Os resultados estão apresentados na Tabela 6.

**Tabela 6.** Distribuição das amostras de fezes positivas para rotavírus pela técnica de PAGE de acordo com a faixa etária dos bezerros, em rebanhos leiteiros e de corte, dos Estados de Minas Gerais, Goiás e Mato Grosso do Sul, no período de 2006 a 2010.

Faixa etária (dias)	Rebanhos leiteiros			Rebanhos de corte			Total (%)
	Amostras	Positivo	%	Amostras	Positivo	%	
<b>1-30</b>	175	4	2,3	250	37	14,8	<b>41 (9,6)</b>
<b>31 – 60</b>	212	6	2,8	99	7	7,1	<b>13 (4,2)</b>
<b>Maior que 60</b>	14	0	0	1	1	100	<b>1 (6,7)</b>
<b>Sem identificação</b>	80	5	6,3	20	0	0	<b>5 (5)</b>
<b>Total</b>	<b>481</b>	<b>15</b>	<b>3,1</b>	<b>370</b>	<b>45</b>	<b>12,2</b>	<b>60 (7,1)</b>

Nos bezerros leiteiros, foi encontrada prevalência de 2,3% (4/175) em animais com idade entre um e 30 dias e 2,8% (6/212) em animais de 31 a 60 dias de idade. Acima dos 60 dias não foram encontrados casos positivos. Em amostras sem identificação de idade, foram verificadas 6,3% (5/80) de amostras positivas. Os dados foram submetidos à análise estatística pelo teste do qui-quadrado e os valores obtidos não apresentaram resultados estatisticamente significativos.

Nos rebanhos de corte, foram detectados 14,8% (37/250) e 7,1% (7/99) de animais positivos na faixa etária de um a 30 e 31 a 60 dias de idade, respectivamente. Para animais acima de 60 dias, uma amostra foi positiva. Dos 20 animais sem identificação, todos foram negativos. A análise estatística pelo teste do qui-quadrado mostrou diferença estatisticamente significativa ( $\chi^2=3,85$ ;  $p<0,05$ ) entre os animais da faixa etária de um a 30 dias e 31 a 60 dias de idade, nos bezerros de corte.

Ao serem comparados bezerros leiteiros e de corte da mesma faixa etária, houve diferença estatística significativa ( $\chi^2= 18,49$ ;  $p<0,05$ ) entre os animais de um a 30 dias de idade, mostrando que a infecção foi mais frequente em bezerros com idade até 30 dias nos rebanhos de corte. No entanto, não houve diferença estatística



significativa entre os bezerros das demais faixas etárias e os dois tipos de exploração pecuária.

A presença de rotavírus relacionada à faixa etária dos animais foi observada com maior frequência em bezerros com menos de 30 dias de idade. Nourmohamnadzadeh et al. (2012) relataram maior prevalência de infecção por rotavírus em bezerros com idade entre duas a quatro semanas e menor em animais na primeira semana de vida. Embora a infecção pelo rotavírus seja significativamente maior em animais com idade até 30 dias (Alfieri et al., 2006), foi possível observar a presença de animais positivos com idade superior à essa faixa etária, representando 4,3% (14/326) das amostras.

Animais jovens são mais suscetíveis à infecção pelo rotavírus devido à reposição lenta do epitélio apical das vilosidades intestinais, facilitando o desenvolvimento completo do ciclo replicativo e a produção viral. Animais adultos tornam-se resistentes à doença porque a reposição dos enterócitos é mais intensa e compete com a replicação viral, de forma que somente as estirpes virais muito virulentas podem causar diarreia em bezerros mais velhos (Crawford et al., 2006). Ainda, bezerros muito jovens são mais susceptíveis à rotavirose por não apresentarem o sistema imune competente, resultando no aumento das taxas de infecção e aumentando a possibilidade de infecções secundárias. O rotavírus é encontrado no ambiente e comumente se faz presente no intestino de animais adultos. As manifestações clínicas da doença estão relacionadas a diversos fatores como nível de imunidade contra o vírus, estirpe viral, infecção concomitante, estresse, lotação, entre outros (Ramig, 2004). Boas práticas de higiene e manejo adequado dos animais associadas com a vacinação materna têm sido adotadas mundialmente no controle e profilaxia da rotavirose em bezerros (Dhama et al., 2009).

### 5.3 DISTRIBUIÇÃO TEMPORAL DE CASOS POSITIVOS DE ROTAVÍRUS

Durante o período de 2006 a 2010 foram analisadas 851 amostras de fezes de bezerros, colhidas entre janeiro e dezembro nos estados de Minas Gerais, Goiás e Mato Grosso do Sul, para detecção de rotavírus. A quantidade de amostras colhidas em cada ano está descrita na Tabela 7.

**Tabela 7.** Distribuição temporal da colheita das amostras de fezes e dos casos positivos de rotavírus em bezerros de rebanhos bovinos leiteiros e de corte, provenientes dos Estados de Minas Gerais, Goiás e Mato Grosso do Sul, no período de 2006 a 2010

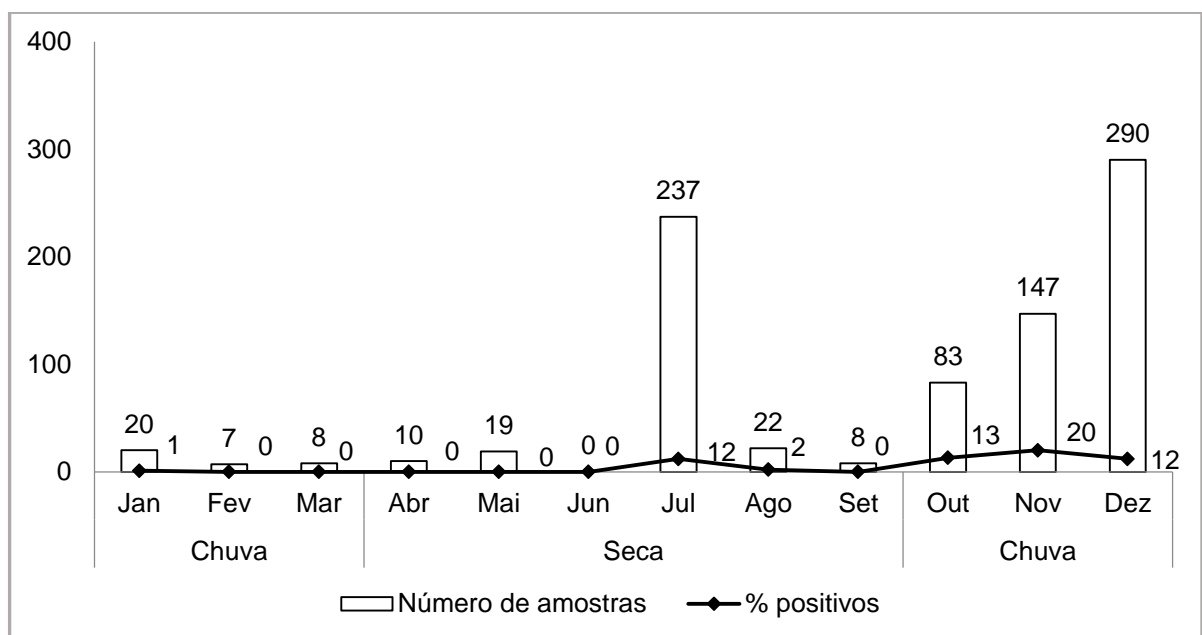
Ano	Nº de amostras colhidas	Nº de amostras positivas	% de amostras positivas
<b>2006</b>	25	3	12
<b>2007</b>	1	0	0
<b>2008</b>	206	20	9,7
<b>2009</b>	103	22	21,4
<b>2010</b>	516	15	2,9
<b>Total</b>	<b>851</b>	<b>60</b>	<b>7,1</b>

A Figura 6 apresenta a frequência de amostras positivas para rotavírus ao longo dos meses dos anos de 2006 a 2010, nos Estados de Minas Gerais, Goiás e Mato Grosso do Sul. No período estudado, verificou-se maior frequência de positivos para rotavírus nos meses de outubro, novembro e dezembro, que são meses caracterizados por serem chuvosos. No mês de julho, houve um aumento da frequência de casos positivos. Este mês compreende o período seco previsto para as regiões estudadas.

A análise estatística entre os casos positivos de rotavírus durante o período seco (abril a setembro, 14 positivos) e chuvoso (outubro a março, 46 positivos) nos anos estudados não foi significativa, mostrando que a ocorrência de rotavirose em bovinos pode ocorrer durante os dois períodos do ano. No entanto, observam-se maiores picos de positivos nos meses de maior precipitação pluviométrica, nos quais pode ocorrer maior contaminação ambiental, aumentando o risco de infecção, além de maior resistência da partícula viral. No mês de julho, considerado do período seco do ano, foi registrado um pico de casos positivos, o que pode ser explicado

pela maior quantidade de amostras colhidas. Ribeiro (2014) encontrou maior frequência de positivos para rotavírus com o aumento da intensidade de chuvas na primavera, sendo o inverno a estação com o menor número de casos. As infecções por rotavírus possuem um padrão sazonal no Japão e em outros países de clima temperado, com picos epidêmicos ocorrendo nos meses mais frios do ano (Abe et al., 2009).

Estudos sobre a distribuição temporal de rotavírus em bovinos são escassos no Brasil e no mundo, no entanto, o monitoramento das infecções pelo vírus é importante para o controle de surtos em seres humanos e animais. Atchison et al. (2010) relataram maior frequência de surtos de diarreias por rotavírus em crianças na Europa no final do inverno e início da primavera, sugerindo que a sazonalidade da infecção possa estar relacionada à fatores meteorológicos.



**Figura 6.** Distribuição temporal do número de amostras de fezes colhidas e de casos positivos de rotavírus em bezerras leiteiras e de corte dos Estados de Minas Gerais, Goiás e Mato Grosso do Sul, no período de 2006 a 2010.

#### 5.4 ANÁLISE DO PERFIL ELETROFORÉTICO DAS ESTIRPES DE ROTAVÍRUS

A análise do perfil eletroforético das estirpes de campo de rotavírus mostrou a existência de uma grande diversidade genômica nos rebanhos examinados. Entre as 32 amostras classificadas, constatou-se a presença de quatro perfis eletroforéticos distintos.

Das 32 amostras com identificação dos perfis, sete foram classificadas como pertencentes ao eletroferótipo D, 12 ao perfil E, três ao perfil F e 10 ao perfil H. Os resultados obtidos da análise dos eletroferótipos encontram-se na Tabela 8.

**Tabela 8.** Perfis eletroforéticos de rotavírus bovino em amostras de fezes de bezerros com um a 90 dias de idade dos Estados de Minas Gerais, Goiás e Mato Grosso do Sul, de acordo com o tipo do rebanho e o município de origem, no período de 2006 a 2010.

Estado Exploração	Rebanho positivo	Amostra positiva	Perfil eletroforético				Amostra não classificada
			D	E	F	H	
<b>Minas Gerais</b>							
<b>Leiteiro</b>							
Bom Jesus da Penha	1	1					1
Carmo do Cajuru	1	3				2	1
Conselheiro Lafaiete	1	2					2
Indianópolis	1	1					1
<b>Corte</b>							
Corinto	1	3					3
<b>Subtotal</b>	<b>5</b>	<b>10</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>8</b>
<b>Goiás</b>							
<b>Leiteiro</b>							
Bom Jesus de Goiás	1	3		2			1
Jataí	1	1					1
Serranópolis	1	3		3			
<b>Corte</b>							
Caçu	1	3					3
Jataí	2	8	6				2
Mineiros	1	3					3
Rio Verde	3	8		4			4
Serranópolis	1	4					4
<b>Subtotal</b>	<b>11</b>	<b>33</b>	<b>6</b>	<b>9</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>18</b>

<b>Mato Grosso do Sul</b>							
<b>Leiteiro</b>							
Costa Rica	1	1					1
<b>Corte</b>							
Cassilândia	1	2	1	1			
Figueirão	2	10		2		8	
Ribas do Rio Pardo	2	3			3		
Rio Negro	1	1					1
<b>Subtotal</b>	<b>7</b>	<b>17</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>8</b>	<b>2</b>
<b>Total</b>	<b>23</b>	<b>60</b>	<b>7</b>	<b>12</b>	<b>3</b>	<b>10</b>	<b>28</b>

De acordo com a velocidade de migração do genoma do rotavírus, nos rebanhos leiteiros pertencentes aos Estados de Mato Grosso do Sul, Minas Gerais e Goiás estavam presentes os eletroferótipos H e E, enquanto os tipos D, E, F e H foram identificados nos rebanhos de corte dos mesmos estados.

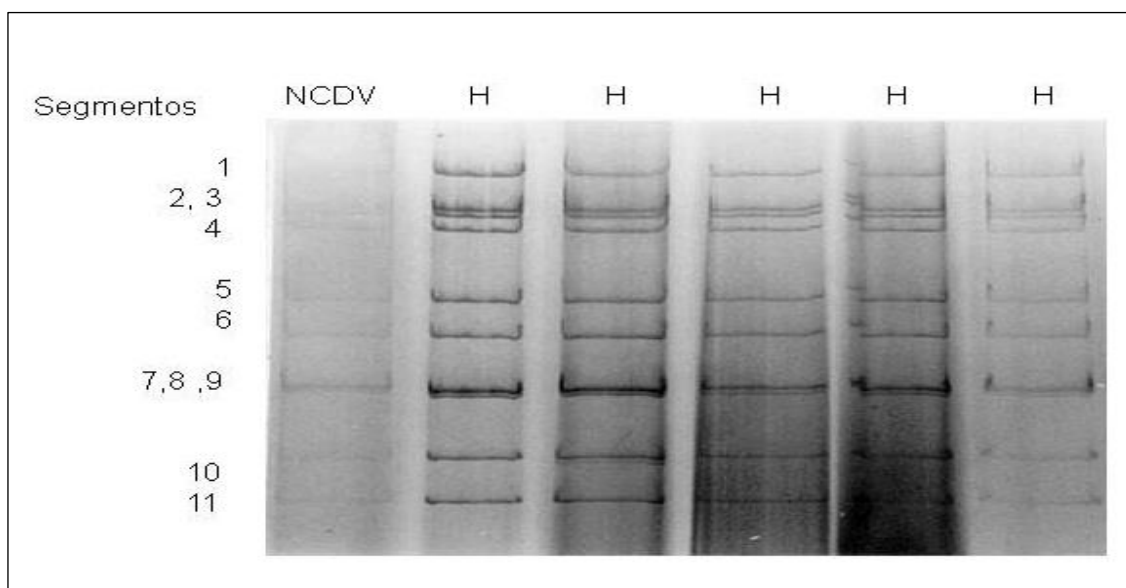
No Estado de Minas Gerais, duas amostras foram possíveis de serem identificadas quanto ao perfil eletroforético, sendo oriundas de rebanho leiteiro do Município de Carmo do Cajuru. No Estado de Goiás, 15 perfis foram identificados, sendo seis do perfil D, pertencentes a rebanhos de corte do Município de Jataí, e nove do perfil E, sendo cinco de rebanhos leiteiros dos Municípios de Bom Jesus de Goiás e Serranópolis e quatro de rebanhos de corte do Município de Rio Verde.

No Estado de Mato Grosso do Sul foi possível detectar uma maior variação de perfis eletroforéticos (D, E, F, H), todos pertencentes a rebanhos de corte. No Município de Cassilândia foram identificados os perfis D e E, em Figueirão, E e H. O perfil F só foi encontrado no Município de Ribas do Rio Pardo. As Figuras 7 e 8 ilustram os diferentes perfis encontrados no estudo.

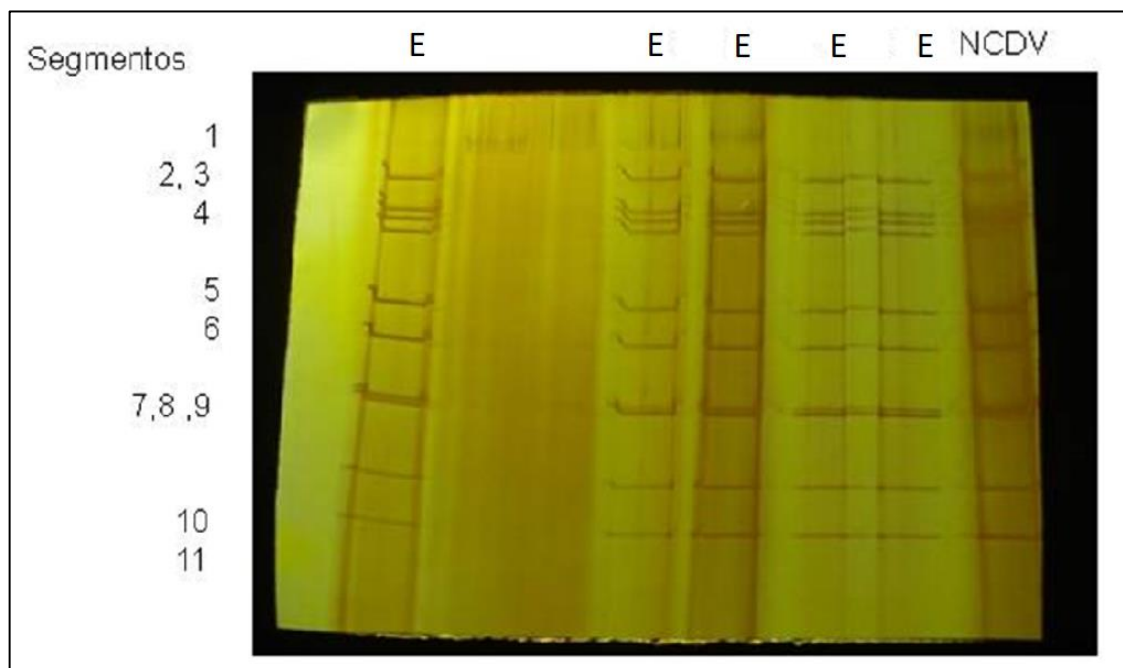
Nota-se que o perfil E foi mais vezes detectado, com exceção do Estado de Minas Gerais, onde não foi encontrado. A análise do perfil do genoma pela PAGE é uma técnica útil para se distinguir diferenças entre estirpes de campo e para fornecer informações sobre o significado epidemiológico da variação genômica dos rotavírus, no entanto, as razões para a ocorrência de eletroferótipos distintos estarem circulando entre os bezerros não foram determinadas. Deve-se levar em consideração o fato de que novas variantes do vírus podem surgir nos rebanhos,

devido principalmente ao acúmulo de mutações pontuais, e também ao rearranjo de genes facilitado pela natureza segmentada do vírus, que podem alterar o genoma viral (Matthijssens; Desselberger, 2012).

Observa-se que no estudo foi detectado uma maior variação de perfis eletroforéticos em rebanhos de corte, contrastando com trabalhos realizados por outros autores em rebanhos bovinos leiteiros, que também detectaram grande variação no perfil eletroforético das amostras (Theil; McCloskey, 1989; Mendes et al. 1993). Resultados semelhantes foram obtidos no Brasil por Jerez et al. (1989), Mendes et al. (1993) e Buzinaro et al. (2000) que identificaram diferentes perfis circulando em rebanhos bovinos.



**Figura 7.** Perfil eletroforético do genoma de rotavírus do grupo A detectado em bezerros de rebanhos de corte do Estado de Mato Grosso do Sul, em comparação com a amostra padrão NCDV. Perfil de amostras classificadas como eletroferótipo H.



**Figura 8.** Perfil eletroforético do genoma de rotavírus do grupo A detectados em bezerros de rebanhos de corte no Estado de Goiás. 1. Linhas 1 a 5 estirpes de rotavírus com o mesmo perfil do genoma (perfil E), e amostra padrão NCDV.

### 5.5 CARACTERIZAÇÃO DOS GENOTIPOS G E P DE ROTAVÍRUS

A caracterização dos genótipos G (VP7) e P (VP4) pela RT-PCR foi realizada nas 60 amostras positivas, no entanto, 29 amostras foram possíveis de ser genotipadas. A análise mostrou duas associações de genótipos diferentes, sendo a G6P[5] verificada com 82,8% (24/29) de prevalência, e a G6P[11], com 17,2% (5/29). Em rebanhos leiteiros, o genótipo G6P[5] foi encontrado em 66,7% (6/9) das amostras e o genótipo G6P[11] em 33,3% (3/9). Nos rebanhos de corte, o genótipo G6P[5] correspondeu a 90% (18/20) das amostras, enquanto o genótipo G6P[11] correspondeu a 10% (2/20) das amostras analisadas.

Nas amostras genotipadas do Estado de Minas Gerais, somente foi detectado o genótipo G6P[5], enquanto no Estado de Goiás ambos os genótipos G6P[5] e G6P[11] estavam circulando nos rebanhos amostrados. No Estado de Mato Grosso do Sul, foram genotipadas apenas amostras de rebanhos de corte, sendo

identificados os genótipos G6P[5] e G6P[11]. Os resultados da genotipagem, de acordo com o estado e tipo de rebanho, estão apresentados na Tabela 9.

**Tabela 9.** Resultados da genotipagem de rotavírus pela técnica de RT-PCR em amostras de bezerros dos Estados de Minas Gerais, Goiás e Mato Grosso do Sul, no período de 2006 a 2010.

Procedência	Genótipo	Total	Rebanho leiteiro		Rebanho de corte	
			Amostras	%	Amostras	%
<b>Minas Gerais</b>	G6P[5]	7	5	71,4	2	28,6
<b>Subtotal</b>		<b>7</b>	<b>5</b>		<b>2</b>	
<b>Goiás</b>	G6P[5]	7	1	14,3	6	85,7
	G6P[11]	3	3	100		0
<b>Subtotal</b>		<b>10</b>	<b>4</b>		<b>6</b>	
<b>Mato Grosso do Sul</b>	G6P[5]	10			10	100
	G6P[11]	2			2	100
<b>Subtotal</b>		<b>12</b>			<b>12</b>	<b>100</b>
<b>Total</b>		<b>29</b>	<b>9</b>	<b>52,9</b>	<b>20</b>	<b>47,1</b>

Devido à natureza segmentada do genoma do rotavírus e sua capacidade de promover recombinações entre diferentes estirpes, a genotipagem de amostras de campo é muito importante. No presente estudo, o genótipo G6P[5] foi o mais frequente entre as amostras, sendo encontrado nos rebanhos dos três estados brasileiros. A predominância de G6P[5] é relatada na Austrália, Irlanda, França e Argentina (Swiatek et al., 2010, Cashman et al., 2010, Badaracco et al., 2012, Kaplon et al., 2013) e já foi descrita no Brasil em rebanhos de ambos os tipos de exploração pecuária (Alfieri et al. 2006, Freitas et al. 2011, Dulgheroff et al. 2016). Por sua vez, o genótipo G6P[11] foi relatado nos rebanhos dos Estados de Goiás e Mato Grosso do Sul, não sendo encontrado em Minas Gerais. Este genótipo já foi



relatado em outros estudos (Reidy et al. 2006, Freitas et al., 2011, Rocha et al., 2017). Rocha et al. (2017) verificou a presença de G6P[11] em rebanhos bovinos vacinados e G6P[5] em rebanhos não vacinados. Diferentemente de outros genótipos de origem animal como G8, G5, G10 e G3, o genótipo G6 ainda não foi descrito infectando seres humanos (Domingues et al., 2008, Dulgheroff et al., 2016). Assim, a constante vigilância dos genótipos circulando entre os bovinos e suas possíveis recombinações é de grande importância.

A utilização de vacinas contra a rotavirose é uma das medidas de prevenção mais eficientes, no entanto, é necessário que as vacinas contenham os genótipos de rotavírus prevalentes em uma determinada região, para protegerem eficazmente os animais. Assim, a continuidade de estudos sobre a diversidade de genótipos é essencial para entender a epidemiologia dessa doença e indicar mudanças nas medidas de profilaxia.

## **6. CONCLUSÃO**

As infecções por rotavírus bovino foram relatadas em rebanhos leiteiros e de corte dos Estados de Minas Gerais, Goiás e Mato Grosso do Sul, no período de 2006 a 2010, sendo uma das causas de diarreia em bezerros. A infecção foi mais frequente em animais com diarreia durante os primeiros 30 dias de vida dos animais, durante os meses chuvosos do ano. A ocorrência de genótipos diferentes circulando nos rebanhos bovinos leiteiros e de corte justifica a importância contínua do estudo dessas infecções e suas implicações na produção pecuária.

## 7. REFERÊNCIAS

Abe M, Ito N, Morikawa S, Takasu M, Murase T, Kawashima T, Kawai JK, Sugiyama, M (2009) Molecular epidemiology of rotaviruses among healthy calves in Japan: Isolation of a novel bovine rotavirus bearing new P and G genotypes. **Virus Research** 144:250-257.

Alfieri A, Alfieri AA Barreiros MA Leite, J P Richtzenhain, L. J. (2004) G and P genotypes of group A rotavirus strains circulating in calves in Brazil, 1996-1999. **Veterinary Microbiology**, 99:167-173

Alfieri AA, Parazzi ME Takiuchi E, Médici KC, Alfieri AF (2006) Frequency of group A rotavirus in diarrhoeic calves in Brazilian cattle herds, 1998-2002. **Tropical Animal Health and Production**. 38:521-526.

Atchison CJ, Tam CC, Hajat S, Van Pelt W, Cowden JM, Lopman BA (2010) Temperature-dependent transmission of rotavirus in Great Britain and The Netherlands. **Proceedings of the Royal Society**, 277:933-942.

Azizzadeh M et al (2011) Characterisation and pattern of culling in Holstein-Friesian dairy herds in Khorasan Razavi Province, Northeast of Iran. **Veterinary Research Forum**, 2:254-258.

Badaracco A, Garaicoechea L, Rodriguez D, Uriarte EL, Odeon A, Bilbao G (2012) Bovine rotavirus strains circulating in beef and dairy herds in Argentina from 2004 to 2010. **Veterinary Microbiology**, 158: 394–399.

Bányai K, Kemenesi GBI, Földes F, Zana B, Marton S, Varga KR, Oldal M, Kurucz, Jakab F (2017). Candidate new rotavirus species in Schreiber's bats, Serbia. **Infection, Genetics and Evolution**, 48, 19-26. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.12.002>.

Barbosa EF, Figueiredo HCP, Garcia AM, Lobato, ZIP, Lage AP (1998) Rotavírus do grupo A em bezerros lactentes no Estado de Minas Gerais. **Ciência Rural**. 28: 435-439,

Barreiros MAB, Alfieri AF, Médici KC, Leite JPG, Alfieri AA (2004). G and P genotypes of group A rotavirus from diarrhoeic calves born to cows vaccinated against the NCDV (P[1], G6) rotavirus strain. **Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health.** 51:104-109.

Bartels CJ, Holzhauser M, Jorritsma R, Swart WA, Lam TJ (2010) Prevalence, prediction and risk factors of enteropathogens in normal and non-normal faeces of young dutch dairy calves. **Preventive Veterinary Medicine,** 93: 162-169.

Bellinzoni RC, Mattion N, La Torre JL (1987) Scodeller E A Incidence of rotavirus in beef herds in Argentina. **Research in Veterinary Science.,** 42: 257-259.

Benesi FJ (1999) Síndrome diarréia dos bezerros. **Revista CRMV-ES,** Vitória, 2(3):10-13.

Bonaduce LM (1990) Bovine diarrhea and a longitudinal survey on aetiology viruses agents. **Veterinary Record,** 23: 45-49.

Bouda J, Ochoa LN, Quirozrocha GF (2000) Interpretação dos perfis de laboratório em bovinos. In: González FHD., Ospina H, Barcelos JO, Ribeiro LA.O. (Eds). **Perfil metabólico em ruminantes: Seu uso em nutrição e doenças nutricionais.** Porto Alegre: UFRGS, p. 19-22.

Brandt CD, Kim HW, Rodriguez WJ, Thomas L, Yolken RH, Arrobio JO, Kapikian A Z, Parrott RH, Chanock RM (1981) Comparison of direct electron microscopy, immune electron microscopy, and rotavirus enzymelinked immunosorbent assay for detection of gastroenteritis viruses in children. **Journal of Clinical Microbiology,** Washington, 12:976-98.

Bridger JC (1994) Non-group A rotaviruses. In: Kapikian, A.Z. **Viral Infections of the Gastrointestinal Tract.** New York: Marcel Dekker, p. 369–407.

Brito WMED, Munford V, Villaça AM (2000) Characterization of mixed infections with diferent strains of bovine rotavirus in an outbreak of diarrhea in dairy herds in Goiás, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology.,** 31:140-145.

Buzinaro MG, Munford V, Brito VMED, Rácz ML, Jerez, JÁ (2000) Caracterização eletroforética e análise de subgrupo de rotavírus em rebanhos bovinos leiteiros do Estado de São Paulo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 52: 555-561.

Buzinaro MG, Mistieri MLA, Carvalho AAB, Samara SI, Regitano LCA, Jerez JA (2003) Prevalência de rotavírus do grupo A em fezes diarréicas de bezerros de corte em sistema semi-intensivo de produção. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. 55: 266-270.

BUZINARO, MG.; SAMARA, S.I.; PEREIRA, E.A.S.; FUENTES, D.B.; OLIVEIRA, M.C.S. (2009). Ocorrência dos genótipos G e P de Rotavírus do grupo A em bezerros de rebanhos de corte no estado de São Paulo, Brasil. **Arquivos de Instituto Biológico**, São Paulo, 76: 99-105.

Cabral, PRF (2014) **Identificação e genotipagem de cepas de rotavírus bovino do grupo a em fezes de bezerros de corte do estado de mato grosso**. 39f. Dissertação (Mestrado em Biociência Animal) Universidade de Cuiabá – UNIC, Cuiabá.

Caruzo T, Brito W, Munford V, Rácz ML (2010) Molecular characterization of G and P-types bovine rotavirus strains from Goiás, Brazil: high frequency of mixed P-type infections. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 105: 1040-1043.

Cashman O, Lennon G, Sleator RD, Power E, Fanning S, O'shea H (2010) Changing profile of the bovine rotavirus G6 population in the south of Ireland from 2002 to 2009. **Veterinary Microbiology**, 146: 238–244.

Castrucci G, Frigeri F, Ferrari M, Cilli V, Aldrovandi V, Caleffi F, (1984) Comparative study of rotavirus strains of bovine and rabbit origin. **Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases**.7:171- 178.

Castrucci G, Frigeri F, Ferrari M, Aldrovandi V, Tassini F, Gatti R (1988) The protection of newborn calves against experimental rotavirus infection by feeding mammary secretions from vaccinated cows. **Microbiologica**, 11: 379–385.

Chigerwe M, Tyler JW, Summers MK, Middleton JR, Schultz LG, Nagy DW (2009) Evaluation of factors affecting serum IgG concentrations in bottled calves. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, 234: 785-789.

Ciarlet M, Hoffmann C, Lorusso E, Baselga R, Cafiero MA, Bányai K, Matthijnssens J, Parreño V, de Grazia S, Buonavoglia C, Martella V 2008. Genomic characterization of a novel group A lamb rotavirus isolated in Zaragoza, Spain. **Virus Genes** 37: 250-265.

Cook N, Bridger J, Kendall K, Gomara MI, El-attar L, Gray J (2004) The zoonotic potential of rotavirus. **The Journal of Infection**, 48: 289-302.

Costa Mendes VM, Beer M, Peenze I, Steele AD (1993) Molecular epidemiology and subgroup analysis of bovine group A rotaviruses associated with diarrhea in South African calves. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 31, n. 12, p. 3333-3335,.

Crawford SE, Patel DG, Cheng E, Berkova Z, Hyser JM, Ciarlet M, Finegold MJ, Conner ME, Estes MK, (2006) Rotavirus viremia and extra intestinal viral infection in the neonatal rat model. **Journal of Virology**, 80: 4820-4832.

Desselberger U, Iturriza-Gomara M, Gray J (2001) Rotavirus epidemiology and surveillance. In: Novartis Foundation Symposium, **Anais...[SI]**: Novartis, 2001, v. 238, p.125- 127.

Dhama K, Chauhan RS, Mahendran M, Malik SV (2009) Rotavirus diarrhea in bovines and other domestic animals. **Veterinary Research Communications Dordrecht**, v.33, p.1-23,.

Domingues AL, Morais AT, Cruz RL, Moreira LP, Gouvêa VS 2008. Rotavirus-associated infantile diarrhea in Uberaba, Minas Gerais, on the wake of the Brazilian vaccination program. **Journal of Clinical Virology**, 43: 298-301.

Donovan, GA, Dohoo IR, Montgomery DM, Bennett FL, (1998) Calf and disease factors affecting growth in female holstein calves in florida, USA. **Preventive Veterinary Medicine** 33:1-10.

Dulgheroff ACB, Pereira WAB, Sarmiento RR, Silva GAV, Naveca FG, Domingues, ALS (2016) Analysis of bovine rotavirus strains circulating in diarrheic dairy calves in Uberaba, Minas Gerais, Brazil, during 2008-2009. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4162-8737>

Estes, M. K. (2001) Rotaviruses and their replication. **Fields Virology**. 4. ed. Philadelphia:, p.1747-1785.

Estes M. K., Kapikian A. (2007) Rotaviruses. **Fields Virology**. Pennsylvania p. 1917-1975.

Ferreira MG, Filho EJJ, Heinemann MB, Carvalho AU, Lage AP, Ferreira PM, Freitas MD (2009) Prevalência de *eimeria*, helmintos, *escherichia coli*, *salmonella*, *rotavirus*, *coronavirus* e *cryptosporidium parvum* em propriedades leiteiras de minas gerais, brasil. **Ciência Animal Brasileira**.115-118.

Freitas PPS, Uyemura SA, Silva DG, Samara SI, Buzinaro MG (2011) Rotavírus bovino: fatores de risco, prevalência e caracterização antigênica de amostras em rebanhos leiteiros no Estado de São Paulo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 63: 4.

Garaicoechea L, Bok K, Jones LR, Combessies G, Odeon A, Fernandez F Parreno V (2006) Molecular characterization of bovine rotavirus circulating in beef and dairy herds in Argentina during a 10-year period (1994-2003). **Veterinary Microbiology**, 118: 1-11.

Garcia A, Ruiz-Santa-Quiteria JA, Orde DC, Sanz R, Gomez BM, Fuente R (2000) Rotavirus and concurrent infections with other enteropathogens in neonatal diarrheic dairy calves in Spain. **Microbiology e infectious diseases**, 23: 175-183,.

Gentsch JR, Glass RI, Woods P, Gouvea V, Gorziglia M, Flores J, Das, BK, Bhan M K (1992) Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, 1365-1373.

Gentsch JR, Laird AR, Bielfelt B, Griffin DD, Banyai K, Ramachandran M, Jain V, Cunliffe NA, Nakagomi O, Kirkwood CD, Fischer TK, Parashar UD, Bresee JS, Jiang B, Glass RI (2005) Serotype diversity and reassortment between human and animal rotavirus strains: Implications for rotavirus vaccine programs. **The Journal of Infectious Diseases**, p.146–159.

Gouvea V, Glass Ri, Woods P, Taniguchi K, Clark HF, Forrester B, Fang Zy. (1990) Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, 276-282,.

Gouvea V, Santos N, Timenetsky MC (1994a) VP4 typing of bovine and porcine group A rotaviruses by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**., 32: 1333-1337.

Herring AJ, Inglis NF, Ojeh CK, Snodgrass DR, Menzies JD (1982) Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. **Journal of Clinical Microbiology**, 16: 473-437,.

Ishizaki H, Sakai T, Shirahata T, Taniguchi K, Urasawa T, Urasawa S, Goto H (1996) The distribution of G and P types within isolates of bovine rotavirus in Japan. **Veterinary Microbiology**, 48:367-372.

Jain V, Das BK, Bhan MK, Glass RI, Gentsch JR (2001), Great diversity of group A rotavirus strains and high prevalence of mixed rotavirus infection in India. **Journal of Clinical Microbiology**, 39: 3524-3529.

Jerez JA, Candeias JAN, Durigon, E.L. (1989). Tipos eletroforéticos de rotavirus bovino. **Revista de Microbiologia**, 20:254-257.

Jerez JA, Brandão PE, Buzinaro MG, Gregori F, Rosales CAR, Ito FH, Sakai T (2002) Detecção de rotavírus e coronavírus em fezes de bezerros neonatos com diarreia criados em vários municípios do Estado de São Paulo, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, 69:19-23.

Kaplon J, Fremy C, Bernard S, Rehby L, Aho S, (2013) Pothier, P.; Ambert-Balay, K. Impact of rotavirus vaccine on rotavirus genotypes and caliciviruses circulating in French cattle. **Vaccine**, 31: 2433-2440.



Kohara J, Hirai T, Mori K, Ishizaki H, Tsunemitsu H (1997) Enhancement of passive immunity with maternal vaccine against newborn calf diarrhea. **The Journal of Veterinary Medical Science**, 59: 1023-1025.

Langoni H, Linhares AC, Avila FA, (2004) Contribuição ao estudo da etiologia das diarreias em bezerros de aptidão leiteira no Estado de São Paulo, Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, 41: 313-319,.

Lorenzetti L, Leme RA, Ribeiro J, Souza VRA, Alfieri AF, Alfieri AA (2013) Neonatal diarrhea by bovine coronavirus (BCoV) in beef cattle herds. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, 34: 3795-3800.

Luchs A, Cilli A, Morillo SG, Carmona RC, Timenetsky C. (2012) Rare G3P[3] rotavirus strain detected in Brazil: possible human-canine interspecies transmission. **Journal of Clinical Virology**;54: 89–92.

Lorenz I, Fagan J, More SJ (2011) Calf health from birth to weaning. II. Management of diarrhoea in pre-weaned calves. **Irish Veterinary Journal**, 64: 9.

Martella V, Banyai K, Ciarlet M, Iturriza-Gomara M, Lorusso E, De Grazia S, Arista S, Decaro N, Elia G, Cavalli A, Corrente M, Lavazza A, Baselga R, Buonavoglia C. (2006) Relationships among porcine and human P[6] rotaviruses: evidence that the different human P[6] lineages have originated from multiple interspecies transmission events. **Virology** 344:509–519.

Lourenço MH, Nicolas LC Cohen J (1981) Scherrer, R.; Bricout, F. Study of human rotavirus genome by electrophoresis: attempt of classification among strains isolated in France. **Annales Institut Pasteur**, 132: 161-173.

Matthijnssens JA, Ciarlet M, Heiman E, Arijs I, Delbeke T, McDonald SM, Palombo E. A, Ituriza-Gomara M, Maes P, Patton JT, Rahman M, Van Ranst M, (2008) Full genome-based classification of rotaviruses reveals a common origin between human Wa-Like and porcine rotavirus strains and human DS-1-like and bovine rotavirus strains. **Journal of Virology**, 82: 3204-3219,.

Matthijnssens J, Ciarlet M, McDonald SM, Attoui H, Banyai K, Brister JR, Buesa J, Esona MD, Estes MK, Gentsch JR, Iturriza-Gomara M, Johne R, Kirkwood CD,

Martella V, Mertens PP, Nakagomi O, Parreno V, Rahman M, Ruggeri FM, Saif LJ, Santos N, Steyer A, Taniguchi K, Patton JT, Desselberger U, Van Ranst M (2011) Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). **Archives of Virology**, 156:1397-1413.

Matthijnssens J, Otto PH, Ciarlet M, Desselberger U, Van Ranst M, Johne R. (2012) VP6 sequence-based cut-off values as a criterion for rotavirus species demarcation. **Archives of Virology**, 157: 1177-82.

McNulty M S, Logan E F, (1983) Longitudinal survey of rotavirus infection in calves. **Veterinary Record**, 13: 33-35.

Mebus CA, Underdahl NR, Rhodes MB, Twiehaus MJ (1969) Calf diarrhoea (scours) reproduced with a virus from a field outbreak. **Nebraska Agricultural Experiment Station, Bull**, 233: 1.

Martella V, Bányai K, Matthijnssens J, Buonavoglia C, Ciarlet M (2010) Zoonotic aspects of rotaviruses. **Veterinary Microbiology**, 140: 246-55.

Matthijnssens, J., Desselberger, U., 2012. Genome diversity and evolution of rotaviruses. In: Hacker, J., Dobrindt, U., Kurth, R. (Eds.), **Genome Plasticity and Infectious Diseases**. ASM Press, 219–241.

Medeiros TNS, Lorenzetti E, Alfieri, AF, Alfieri AA (2014) Severe diarrhea outbreak in beef calves (*Bos indicus*) caused by G6P[11], an emergent genotype of bovine rotavirus group A. **Pesquisa Veterinária Brasileira.**, 34: 717-722.

Mendes VMC, Beer M, Peenze I (1993) Molecular epidemiology and subgroup analysis of bovine group A rotaviruses associated with diarrhea in South African calves. **Journal of Clinical Microbiology**, 31: 3333-3335.

Midgley SE, Banyai K, Buesa J, Halaihel N, Hjulsager CK, Jakab F, Kaplon J, Larsen LE, Monini M, Poljsak-Prijatelj M, Pothier P, Ruggeri FM, Steyer A, Koopmans M, Bottiger B (2012) Diversity and zoonotic potential of rotaviruses in swine and cattle across Europe. **Veterinary Microbiology** 156:238–245.

Mihalov-Kovács E, Gellért U, Măerton SF, Fehér E, Oldal MJ, Martella F, Bányai K (2015). Candidato novo rotavírus espécies em abrigos cães, Hungria. **Emergency Infectar**. Dis. 21, 660-663. <http://dx.doi.org/10.3201/eid2104.141370>

Miyazaki A, Kuga K, Suzuki T, Kohmoto M, Katsuda K, Tsunemitsu H (2011) Genetic diversity of group A rotaviruses associated with repeated outbreaks of diarrhea in a farrow-to-finish farm: identification of a porcine rotavirus strain bearing a novel VP7 genotype, G26. **Veterinary Microbiology**, 165: 190-199.

Mohd Nor, N, Steeneveld W, Mourits, MC M, Hogeveen H. Estimating the costs of rearing Young dairy cattle in the Netherlands using a simulation model that accounts for uncertainty related to diseases. **Preventive Veterinary Medicine**, 106:214-224.

Nimer, E. (1989), **Climatologia do Brasil**. 2 ed. Rio de Janeiro: IBGE: Departamento de Recursos Naturais e Estudos Ambientais.

Ok M, L Güler, K Turgut, U Ok, İ Şen, İK Gündüz, MF Birdane, H Güzelbekteş, (2009). The studies on the aetiology of diarrhoea in neonatal calves and determination of virulence gene markers of *Escherichia coli* strains by multiplex PCR. **Zoonoses Public Health** 56: 94-101.

Oliveira CS, Linhares AC, Bellesi N, Mascarenhas JDP, Freitas RB, Gabbay YB, Monteiro TF (1994) Tripla infecção por rotavírus em uma criança de Belém, Pará. **Jornal de Pediatria** 70:240-242.

Papp, H László, B Jakab, F Ganesh, B DE Grazia, S Matthijnssens, J Ciarlet, M Martella, V Bányai, K. Review of group A rotavirus strains reported in swine and cattle. **Veterinary Microbiology**, 165:190-199.

Parashar UD, Hummelman EG, Bresee JS, Miller, MA, Glass RI (2003) Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. **Emerging Infectious Diseases**, 9: 565-572.

Paul PS, Lyoo YS (1993) Immunogens of rotaviruses. **Veterinary Microbiology**, 37: 299-317.

Pereira HG, Azeredo RS, Leite JPG, Barth OM, Suttmoller F, De Farias V, Vidal MNP (1983) Comparison of polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), immuno-electron

microscopy (IEM) enzyme immunoassay (EIA) for the rapid diagnosis of rotavirus infection in children. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 78: 483-490.

Pereira HG, Azeredo RS, Leite JPG, Andrade ZP, Castro LAA (1985) Combined enzyme immunoassay for rotavirus and adenovirus (EIARA). **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, 10: 21-8.

Ramig RF (2004) Pathogenesis of intestinal and systemic rotavirus infection. **Journal of Virology**, 78: 10-20.

Robison JD, Stott GH, Denise SK (1988) Effects of passive immunity on growth and survival in the dairy heifer. **Journal of Dairy Science** 71:1283-1287.

Saif LJ, Smith KL, Landmeier BJ (1984) Immune response of pregnant cows to bovine rotavirus immunization. **American Journal of Veterinary Research**, 45: 49-58.

Santos N, Hoshino Y (2005) Global distribution of rotavirus serotypes/ genotypes and its implication for the development and implementation of na effective rotavirus vaccine **Reviews in medical virology**, 15: 29–56.

Schwers A, Pastoret PP, Maenhoudt M, Dgenais L, Broecke, CV, Goossens, A, Werenne J (1983) Experimental reproduction of rotavirus diarrhoea in colostrum deprived newborn calves. **Annales de recherches vétérinaires. Annals of veterinary research**, 11: 265-270.

Silva LC, Sanches AA, Gregori F, Brandão PE, Alfieri AA, Headley AS (2012) First description of group A rotavirus from fecal samples of ostriches (*Struthio camelus*). **Research in Veterinary Science**, 93:1066-9.

Snogross DR, Terzolo HR, Campbell D, Sherwood I, Menzies JD, Synge, BA (1986) Aetiology of diarrhea in young calves. **The Veterinary record**, 119:31-34.

Suphoronski SA, Lorenzetti E, Ribeiro J, Medeiros TNS, Pannuzio C, Possatti F, Pereira FL, Massi RP, Bom V, Oliveira MV, Alfieri AF, Alfieri AA, Perfil da infecção entérica por rotavirus e coronavírus em bezerros de corte lactentes criados em sistema extensivo na região centro-oeste, Brasil. I Congresso de **Pesquisa em**

**Saúde Animal e Humana.** < acesso em <http://periodicos.uem.br/ojs/index.php/RevCiVet/article/viewFile/33394/pdf>

L. Svensson, B.B. Finlay, D. Bass, C.H. Bonsdorff, H.B. Greenberg (1991) Symmetric infection of rotavirus on polarized human intestinal epithelial (Caco-2) cells. **Journal of Virology**, 65: 4190-4197.

Swiatek DL, Palombo EA, Lee A, Coventry MJ, Britz ML, Kirkwood CD (2010) Detection and analysis of bovine rotavirus strains circulating in Australian calves during 2004 and 2005. **Veterinary Microbiology**, 140, 56–62.

TIZARD IR (2002). **Imunologia veterinária: uma introdução**. 6.ed. São Paulo: Roca, p.233-246.

Theil K W, Mccloskey CM (1989) Molecular epidemiology and subgroup determination of bovine group A rotaviruses associated with diarrhea in dairy and beef calves. **Journal of Clinical Microbiology**, 27:126-131.

Thrusfield, M (2005) Observational studies. In: Thrusfield, **Veterinary Epidemiology**. 3 ed. Blackwell Publishing Oxford, 15: 266-288.

Torsein M, Lindberg A, Hallén Sandgren C, Persson Waller K, Törnquist M, Svensson C (2011) Risk factors for calf mortality in large Swedish dairy herds. **Preventive Veterinary Medicine**, 99: 136-147.

Trojnar E, Sachsenroder J, Twardziok S, Reetz J, Otto P.H, Johne R. (2013) Identification of an avian group A rotavirus containing a novel VP4 gene with a close relationship to those of mammalian rotaviruses. **The Journal of General Virology**, 94:136–142.

Tsunemitslj H, Shimizu M, Rira T, Yonemicui, Kijdo, T, Mori IC, (1989) Onoe, S. Protection against bovine rotavirus in newborn calves by continuous feeding of immune colostrum. Japanese Journal of **Veterinary Science**, 5:300-308,.

- Wani SA, Bhat MA, Ishag SM, Ashrafi MA, Buch AS, Haq M (2003) Detection of a mammalian-like group A rotavirus in diarrhoeic chicken. **Veterinary Microbiology**, 94: 13-18
- Wei S, Gong Z, Che T, Guli A, Tian F (2013). Genotyping of calves rotavirus in China by reverse transcription polymerase chain reaction. **Journal of Virological Methods** 189: 36-40.